N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 11.693

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par

Jeannine MARCHETTI

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Contribution à l'étude des interactions entre hormone antidiurétique et hormones corticosurrénaliennes.

Soutenue le 26 septembre 1975 devant la Commission d'Examen :

M.	S. JARD	Président
Mme	C. MIAHLE-VOLOSS	Examinateur
M.M.	M. BOULANGE	Examinateur
	J. MENARD	Examinateur
	J. ROFFI	Examinateur

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548908_0022

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 11.693

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

par

Jeannine MARCHETTI

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Contribution à l'étude des interactions entre hormone antidiurétique et hormones corticosurrénaliennes.

Soutenue le 26 septembre 1975 devant la Commission d'Examen :

M.	S. JARD	Président
Mme	C. MIAHLE-VOLOSS	Examinateur
M.M.	M. BOULANGE	Examinateur
	J. MENARD	Examinateur
	J. ROFFI	Examinateur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT - PROPOS

Le problème des interactions entre hormone antidiurétique et hormones corticosurrénaliennes est un sujet de préoccupation déjà ancien du Laboratoire de Physiologie de la Faculté "B" de Médecine de Nancy que dirige Monsieur le Professeur BOULANGÉ.

Monsieur le Professeur BOULANGÉ nous a accueilli dans son laboratoire en octobre 1968 et c'est lui qui nous a initié aux problèmes physiopathologiques se rapportant au métabolisme hydrominéral. L'intérêt qu'il porte à ce domaine particulièrement complexe a suscité notre curiosité scientifique dans cette voie. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur S. JARD, Professeur de Physiologie à l'Université Pierre et Marie Curie de Paris VI, nous a fait l'honneur de s'intéresser à notre travail et a accepté la direction de cette thèse. En nous permettant d'effectuer un stage dans son laboratoire, nous avons pu réaliser l'étude qui fait l'objet du chapitre concernant "les effets de la surrénalectomie et des corticoïdes sur l'activité de l'adényl-cyclase du rein de Rat, sensible à l'hormone antidiurétique". Nous avons toujours trouvé dans son laboratoire tant auprès de lui-même que de ses collaborateurs un accueil chaleureux ainsi qu'un environnement intellectuel riche et stimulant. Aussi, nous tenons tout particulièrement à lui exprimer notre profonde gratitude.

Nous désirons aussi adresser nos très vifs remerciements à Madame MIAHLE, Directeur de Recherche à l'Institut de Physiologie de Strasbourg, à Monsieur le Professeur MENARD, Maître de Conférence agrégé à l'U.E.R des Sciences Médicales de Broussais - Paris VI et à Monsieur le Professeur ROFFI, Professeur de Physiologie à la Faculté d'Orsay, qui ont accepté de faire partie du jury de cette thèse.

La dissection des tissus nerveux a été effectuée par les soins de Madame A. BURLET, attachée de recherche au C.N.R.S. Nous lui adressons nos sincères remerciements.

Les résultats présentés dans le troisième chapitre sont les fruits d'une collaboration étroite avec Monsieur R. RAJERISON, Assistant à l'Université Pierre et Marie Curie de Paris VI. Nous avons bénéficié de sa grande expérience dans le domaine du mécanisme d'action cellulaire des hormones et gardons un excellent souvenir de sa bonne humeur. Nous lui adressons notre amicale reconnaissance.

Nous remercions très sincèrement Madame Claudine LUROT qui a assuré la présentation définitive de ce travail.

Une partie importante de cette recherche a été réalisée dans le cadre du contrat passé avec la Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés et a bénéficié d'une aide de la Fondation Française pour la Recherche Médicale.

ABREVIATIONS

ACTH : Hormone adrénocorticotrope (adrenocorticotropic hormone), corticotrophine.

ADH : hormone antidiurétique, vasopressine.

ADP : Adénosine - diphosphate.

AMP : Adenosine - monophosphate.

AMPc : Adénosine 3'-5' cyclophosphate.

ATP : Adénosine - triphosphate.

AVP : Arginine - vasopressine, ARG^{8}- vasopressine.

AVT : Arginine - vasotocine, ILE^{3}-ARG^{8}-vasopressine

CRF : Corticotrophic releasing factor, facteur hypothalamique de libération de la corticotrophine hypophysaire.

DMSO : Dimethyl - sulfoxide.

EM : Eminence médiane

LN : Lobe nerveux de l'hypophyse, neurohypophyse.

LVP : Lysine-vasopressine, LYS^{8}-vasopressine.

NSO : Noyaux supra-optiques.

PTH : Parathormone.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION 1

CHAPITRE PREMIER : METHODOLOGIE 9

A-- DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'HORMONE ANTIDIURETIQUE 9

1 - Principe 9

2 - Description des méthodes expérimentales 11

a) préparation et purification de la vasopressine marquée 11

b) obtention d'immunsérums anti-LVP 16

c) techniques d'extraction du peptide 18

d) protocole du dosage radioimmunologique 21

e) dosage biologique 24

3 - Propriétés de l'hormone marquée 30

a) activité immunologique de la vasopressine iodée 30

b) activité biologique de la vasopressine iodée 33

4 - Propriétés des immunsérums anti-LVP 36

a) évolution de la formation des anticorps anti-LVP - mise en évidence de leur action sur l'hormone endogène et exogène 36

b) spécificité des anticorps anti-LVP - détermination du site antigénique de l'hormone antidiurétique 39

c) modèle de l'interaction vasopressine-anticorps spécifiques 45

5 - Discussion du choix du protocole 52

a) détermination de la courbe standard 52

b) caractéristiques de la courbe standard 56

c) choix du plan expérimental 58

6 - Validité du dosage 60

a) évaluation de l'hormone antidiurétique dans les lobes nerveux de Rat - comparaison avec le dosage biologique 60

b) dosage de l'hormone antidiurétique dans les urines 62

c) essai d'application de la méthode radio-immunologique à l'évaluation de l'hormone dans les extraits plasmatiques 65

B - TECHNIQUES BIOLOGIQUES : DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES ADENYL-CYCLASIQUES RENALES ET MESURE DE LA LIAISON DE LA VASOPRESSINE TRITIEE AUX RECEPTEURS RENAUX 68

1 - Mesure de l'activité adényl-cyclasique sensible à l'hormone antidiurétique dans les membranes plasmiques de rein de Rat 68

a) préparation des membranes plasmiques 68

b) technique de la mesure enzymatique 70

c) conditions expérimentales imposées par l'instabilité et la variabilité des préparations enzymatiques 72

2 - Mesure de la fixation de la vasopressine tritiée aux membranes plasmiques rénales de Rat 74

a) méthode utilisée pour l'étude de la fixation 74

b) caractéristiques de la liaison vasopressine-récepteurs membranaires 75

C - AUTRES MATERIEL ET METHODES 78

1 - Animaux 78

2 - Mesures de la créatinine, des électrolytes et de l'osmolalité urinaire et plasmatique 79

CHAPITRE DEUXIEME : ROLE DES GLUCOCORTICOIDES DANS LA SECRETION DE L'HORMONE ANTIDIURETIQUE 81

A - INTRODUCTION 81

B - BILAN DE L'HORMONE ANTIDIURETIQUE CHEZ LE RAT APRES SURRENALECTOMIE 85

1 - Chez le Rat surrénalectomisé soumis à un régime sodé .. 85

a) détermination de la vasopressinémie 86

b) évolution de l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique 88

c) modifications du contenu en ADH des différents tissus nerveux 88

2 - Bilan de l'hormone antidiurétique établi chez le Rat non compensé en sodium 95

a) détermination de la vasopressinémie 95

b) modifications du contenu en ADH des tissus nerveux 95

C - EFFETS DES CORTICOIDES SUR LA SECRETION DE L'HORMONE ANTIDIURETIQUE 96

1 - Effet de la dexaméthasone 98

a) excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique au cours du traitement 100

b) contenu en ADH de la neurohypophyse après administrations répétées de dexaméthasone 100

2 - Effet de l'aldostérone 100

a) excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique au cours du traitement 100

b) contenu en ADH de la neurohypophyse 102

E - DISCUSSION 102

CHAPITRE TROISIEME : EFFETS DE LA SURRENALECTOMIE ET DES CORTICOIDES SUR L'ACTIVITE DE L'ADENYL-CYCLASE DE REIN DE RAT SENSIBLE A L'HORMONE ANTIDIURETIQUE 111

A - INTRODUCTION 111

B - EFFETS DE LA SURRENALECTOMIE SUR L'ACTIVITE DE L'ADENYL-CYCLASE RENALE, STIMULEE PAR LA VASOPRESSINE 117

C - EFFETS DES CORTICOIDES SUR L'ACTIVITE DE L'ADENYL-CYCLASE RENALE SENSIBLE A L'HORMONE ANTIDIURETIQUE 122

1 - Action de l'aldostérone 122

2 - Action de la dexaméthasone 122

3 - Effets des corticoïdes sur l'activité enzymatique dans les conditions d'expérimentation "in vitro" 124

D - LES CORTICOIDES SONT CAPABLES D'AUGMENTER LE NOMBRE DE RECEPTEURS RENAUX LIANT SPECIFIQUEMENT L'HORMONE ANTI-DIURETIQUE - CES MODIFICATIONS EXPLIQUENT-ELLES A ELLES SEULES LEUR INFLUENCE SUR LA STIMULATION DE L'ADENYL-CYCLASE PAR L'ADH 129

1 - Effets de la surrénalectomie sur la capacité de liaison de ^{3}H-LVP aux récepteurs rénaux 130

2 - Action des corticoïdes sur la capacité de liaison de la vasopressine au niveau du rein - Intervention de la dexaméthasone dans l'efficacité du couplage récepteur-adényl-cyclase 132

a) effet de l'aldostérone 132

b) effet de la dexaméthasone 135

E - DISCUSSION 135

CHAPITRE QUATRIEME : RELATIONS POSSIBLES ENTRE L'EXCRETION RENALE HYDRO-ELECTROLYTIQUE ET L'ACTIVATION DE L'ADENYL-CYCLASE SENSIBLE A L'HORMONE ANTIDIURETIQUE 140

A - CLEARANCES DE L'EAU LIBRE ET EXCRETION DES ELECTROLYTES CHEZ LE RAT SURRENALECTOMISE ET CHEZ LE RAT SOUMIS A DIFFERENTS TRAITEMENTS EN CORTICOIDES 140

1 - Signification des mesures de clearances 140

2 - Résultats et discussion des mesures 143

a) excrétion urinaire de l'eau et des electrolytes chez le rat surrénalectomisé soumis à un régime sodé 143

b) effets de l'aldostérone sur l'excrétion urinaire de l'eau et des ions 148

c) modifications de l'excrétion urinaire de l'eau et des ions à la suite d'un traitement à la dexaméthasone 151

B -SCHEMAS D'EXPLICATIONS POSSIBLES DE L'EFFET DE LA DEXAMETHASONE SUR LA STIMULATION DE L'ADENYL-CYCLASE PAR L'HORMONE ANTIDIURETIQUE 154

1 - Influence, sur l'excrétion hydrique, des modifications du mécanisme d'action de la vasopressine engendrée par la surrénalectomie et les glucocorticoïdes 154

2 - Un rapprochement entre la réabsorption sodée et l'activité de l'adényl-cyclase sensible à l'hormone antidiurétique est-il possible ? 156

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE 159

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le rôle primordial de la vasopressine et des corticoïdes dans l'équilibre hydroélectrolytique est établi depuis fort longtemps et l'observation de certains troubles cliniques du métabolisme hydrominéral a conduit à s'interroger sur les interactions entre hormone antidiurétique et hormones corticosurrénaliennes. Les mécanismes selon lesquels les hormones interréagissent à différents niveaux font l'objet de nombreuses controverses. Elles apparaissent essentiellement dans l'ensemble des travaux consacrés à l'hypervasopressinisme chez les patients insuffisants surrénaux ou chez les animaux surrénalectomisés. Les divergences portent non seulement sur la mise en évidence de l'hypervasopressinisme, mais aussi sur son éthiopathogénie. Ces contradictions se comprennent d'ailleurs fort bien, quand on songe aux difficultés du dosage de la vasopressine et à la complexité des rapports entre hormone antidiurétique et hormones corticosurrénaliennes (BAISSET et MONTASTRUC, 1959).

Lorsqu'en 1931, ROWNTREE et SNELL ont remarqué que les patients en état d'insuffisance surrénale éliminaient avec retard une surcharge hydrique, il a semblé logique a priori d'incriminer ce phénomène d'opsiurie à une hypersecrétion d'hormone antidiurétique. Cependant, l'absence des techniques de dosage de l'ADH rendait impossible toute vérification expérimentale de cette hypothèse. Par ailleurs, SILVETTE et BRITTON (1938) mettaient en évidence les propriétés diurétiques des extraits corticosurrénaux. Ces auteurs suggéraient alors l'existence d'un antagonisme fonctionnel corticoposthypophysaire. A la suite des travaux de COREY et coll. (1939) et surtout de GAUNT et coll. (1949), on a admis pendant plusieurs années qu'un hypervasopressinisme et un antagonisme entre ADH et hormones corticosurrénaliennes au niveau du rein pouvaient être à l'origine de cette rétention hydrique. Mais là encore aucune confirmation expérimentale ne put être apportée, des essais d'estimation de l'ADH basés sur des techniques de dosage approximatives et peu satisfaisantes conduisant à des résultats discordants (BIRNIE et coll., 1950 ; LLOYD et LOBOTSKY, 1950 ; LEAF et coll., 1952 ; AMES et Van DYKE, 1952 ; CAVALLERO et coll., 1954). A la suite des progrès dans les techniques des dosages des hormones et en particulier grâce aux sensibilités élevées obtenues à l'aide de certains essais biologiques, il semblait à priori

possible de doser correctement l'ADH dans le plasma et d'apporter ainsi une preuve directe à l'hypervasopressinisme chez les insuffisants surrénaux. Néanmoins, au cours de ces dernières années, deux théories ont continué à s'affronter. D'un côté, AHMED et ses collaborateurs (1967) mettaient en évidence un taux plasmatique d'ADH anormalement élevé chez les insuffisants surrénaux et concluaient que la difficulté qu'éprouvaient les patients à éliminer toute surcharge d'eau était à mettre sur le compte d'une concentration d'ADH excédentaire ; de l'autre, KLEEMAN et coll. (1964) ne trouvaient aucune modification de la vasopressinémie au cours d'états d'insuffisance surrénale et expliquaient alors l'opsiurie observée par la disparition de l'effet du cortisol au niveau du rein, cette disparition facilitant la perméabilité à l'eau des parties distales du néphron. Cette controverse a été en partie levée à la suite des expériences de GREEN et coll. (1970) qui étudièrent l'élimination urinaire d'une surcharge hydrique chez les rats Brattleboro, chez lesquels un diabète insipide résultait d'un défaut de synthèse de l'hormone antidiurétique. Ces expériences montraient que l'hormone antidiurétique n'était pas le facteur responsable de l'opsiurie observée après l'ablation des surrénales ; elles tendaient en outre à prouver que la perturbation de l'élimination de l'eau résultait plutôt du manque de glucocorticoïdes. Une autre explication, néanmoins, a été proposée par UFFERMAN et SCHRIER (1972) qui réussirent à conserver une réponse rénale normale aux surcharges hydriques chez des chiens surrénalectomisés grâce à un apport sodé important complété par un traitement à la desoxycorticostérone. Pour ces auteurs, l'opsiurie observée résultait essentiellement d'un déficit en ions sodium. Si, à la suite des expériences de GREEN et coll. (1970), il est manifeste que l'hormone antidiurétique n'est pas la cause essentielle de l'opsiurie observée chez les insuffisants surrénaux, un hypervasopressinisme lié à l'absence ou à l'hypofonctionnement des glandes surrénales a néanmoins été mis en évidence dans certaines conditions. SHARE et TRAVIS (1970-1971) ont montré une concentration plasmatique élevée de vasopressine, 5 à 6 fois supérieure à la normale, chez les chiens surrénalectomisés auxquels on a supprimé tout traitement compensateur en sels et en corticoïdes. La vasopressinémie de ces animaux diminuait après perfusion d'une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. cent, en quantité suffisante pour compenser la perte de poids. Une heure après une injection intraveineuse de cortisol, le taux d'ADH augmenté par la surrénalectomie n'était pas réduit ; les auteurs concluaient alors que la secrétion accrue d'hormone antidiurétique observée après surrénalectomie résultait de la contraction des espaces ex-

tracellulaires entrainée par les pertes sodées. Cependant, au cours d'une seconde expérimentation, ces mêmes auteurs remarquaient que deux heures après une injection de cortisol, la concentration plasmatique en ADH des chiens privés de surrénales restait élevée, mais était vingt fois moins importante que celle des chiens surrénalectomisés auxquels on avait administré une solution placebo constituée de chlorure de sodium à 0,9 p. cent et de dextran à 6 p. cent. Dans ces conditions, les animaux surrénaloprives qui ne recevaient pas de cortisol libéraient des quantités très importantes d'hormone antidiurétique et les expérimentateurs pensaient que cette libération était consécutive à un stress émotionnel non spécifique. La présence de cortisol empêchait la libération exagérée de vasopressine, impliquant alors un contrôle des glucocorticoïdes sur la secrétion de l'hormone antidiurétique. Une telle activité régulatrice des glucocorticoïdes sur la secrétion d'ADH avait déjà été suggérée par AHMED et coll. (1967). En effet, l'hypervasopressinémie mise en évidence par ces auteurs chez quelques sujets insuffisants surrénaux résultait, selon eux, de la diminution de l'action inhibitrice du cortisol sur la synthèse de l'hormone antidiurétique. CUILLIER (1967), après avoir mis en évidence une excrétion accrue d'ADH chez les sujets déficients en 21-hydroxylase, se rallie à cette théorie. Certaines expériences suggèrent par ailleurs l'existence d'inter-contrôles hormonaux entre cortex surrénal et couple hypothalamo-neurohypophysaire. En effet, des doses élevées de vasopressine provoquent la secrétion de glucocorticoïdes en agissant soit directement sur le cortex surrénal, ou selon le schéma proposé par HEDGE et coll. (1966) en faisant intervenir l'action du CRF (ADH ⟶ CRF ⟶ ACTH ⟶ cortisol). En revanche, l'administration de glucocorticoïdes exogènes diminue la libération d'hormone antidiurétique provoquée par différentes sortes d'agressions (GAUNT et Coll., 1957 ; Mc CANN et coll., 1958 ; De WIED et coll., 1959 ; DINGMAN et DESPOINTES, 1960, MIAHLE-VOLOSS et coll., 1967).

Alors que certains auteurs expliquent l'hypervasopressinisme chez les insuffisants surrénaliens par la diminution de l'effet inhibiteur du cortisol au niveau du complexe hypothalamo-neurohypophysaire, d'autres ont attribué l'excès d'ADH à un défaut de sa destruction hépatique qui nécessiterait, selon eux, l'intervention des corticoïdes (BIRNIE, 1953 ; GINSBURG, 1954). Cependant, cette hypothèse fut contredite par la suite par HANKISS et coll. (1965) pour lequel les glucocorticoïdes n'entrent pas en jeu dans le métabolisme hépatique et rénal de l'hormone antidiurétique, tant

chez l'animal normal que surrénalectomisé.

Par ailleurs, ADH et hormones corticosurrénaliennes interréagissent au niveau du rein. En effet, si l'hormone antidiurétique n'intervient pas (ou intervient secondairement) dans le phénomène d'opsiurie observé chez les insuffisants surrénaux, l'absence de minéralocorticoïdes induit une diminution du pouvoir de concentration du rein par l'ADH. Dès 1942, KOTTLE et coll., ont remarqué que les urines de chiens surrénalectomisés et deshydratés étaient moins concentrées que celles de chiens normaux pareillement privés d'eau. Quelques années plus tard, après la découverte de l'aldostérone (SIMPSON et TAIT, 1952), WEST et coll. (1955), puis JONES et de WARDENER (1956) ont montré que ce stéroïde pouvait influencer la réponse du rein à l'hormone antidiurétique. En fait, après avoir observé que les urines des sujets normaux étaient plus concentrées après une épreuve de soif de 48 heures qu'après administration de doses saturantes de vasopressine et sachant que la deshydratation détermine à la fois une secrétion accrue d'aldostérone et d'ADH, les auteurs ont administré simultanément ces deux hormones à des sujets normalement hydratés. Ils ont ainsi obtenu des effets urinaires plus prononcés qu'en injectant seulement de la vasopressine. Par la suite, GUINNEBAULT (1962) a montré nettement que la chute du pouvoir de concentration du rein du hamster surrénalectomisé s'explique par un effacement du gradient de concentration cortico-papillaire du sodium. Cette anomalie rénale pouvait être corrigée par l'administration d'aldostérone. KESSLER et coll. (1964), SIGLER et coll. (1965), REVILLE et STEPHAN (1967) ont aussi confirmé ces observations. Ainsi, en agissant sur l'hypertonie papillaire, l'aldostérone modifie la réponse rénale à l'hormone antidiurétique.

Une influence directe des corticoïdes sur les activités hydro-osmotiques et natriferiques de la vasopressine au niveau des cellules epithéliales de la vessie des Amphibiens (cellules qui présentent des propriétés de perméabilité analogues à celles du néphron) a fait, au cours de ces dernières années l'objet de recherches. Les premiers résultats se sont avérés négatifs. En effet, selon CRABBÉ (1963), ni l'aldostérone, ni le cortisol, ni la corticostérone n'affectent les réactions à l'ADH de la vessie de Bufo marinus. De même MARUMO (1968) est incapable de montrer un effet du cortisol sur les activités hydro-osmotiques et natriferiques du peptide neurohypophysaire au niveau de la vessie de Bufo bufo japonicus. En revanche, FANESTIL et coll. (1967) ont remarqué une intensification de la stimulation du transport du sodium par la vasopressine, lorsque les vessies ont été auparavant

traités par l'aldostérone. Dans une étude plus détaillée, HANDLER et coll. (1969) ont confirmé la potentialisation de l'effet natriferique de l'hormone antidiurétique par l'aldostérone au niveau de la vessie de crapaud ; ils ont également montré que ce stéroïde augmentait la perméabilité osmotique à l'eau induite par la vasopressine et que les glucocorticoïdes amplifiaient également les mouvements de l'eau et du sodium provoqués par l'hormone antidiurétique.

Les interactions entre hormone antidiurétique et hormones surrénaliennes peuvent donc s'effectuer principalement à deux niveaux : au niveau du complexe hypothalamo-neurohypophysaire ou au niveau des effecteurs hormonaux, en particulier du rein ; mais la modalité de ces interactions reste mal connue.

En tenant compte de ces deux localisations possibles des interactions hormonales nous avons tout d'abord essayé, au cours de ce travail, de préciser le rôle des glucocorticoïdes sur les structures nerveuses d'élaboration ou de stockage de l'hormone antidiurétique. Il s'agissait de savoir si les hormones corticosurrénaliennes interviennent en inhibant la synthèse hypothalamique de la vasopressine ou en empêchant sa libération au niveau de la neurohypophyse. Cette étude a été essentiellement effectuée chez des rats surrénalectomisés qui recevaient un traitement compensateur en chlorure de sodium. Après avoir vérifié la présence d'un hypervasopressinisme chez ces animaux privés de surrénales depuis 3 ou 8 jours, il semblait intéressant pour aborder ce problème de connaître comment évoluait, dans ces conditions, le contenu en ADH des différentes structures nerveuses : noyaux supra-optiques, éminence médiane, neurohypophyse. Il convenait par ailleurs de vérifier si l'hypervasopressinisme ainsi que les anomalies constatées dans le contenu en hormones des structures nerveuses provenaient bien de l'absence de glucocorticoïdes. Pour ce faire, nous avons observé ce que devenaient l'hypervasopressinisme et la composition des structures nerveuses lorsque l'on traitait les rats surrénalectomisés à la dexaméthasone. Ces résultats ont ensuite été confrontés à ceux que donnait un traitement à l'aldostérone dans les mêmes conditions.

Une technique de dosage sensible, précise, reproductible de l'hormone antidiurétique permettant l'évaluation simultanée de plusieurs extraits s'avérait alors nécessaire pour aborder cette étude. Aussi avons-nous entrepris au préalable la mise au point du dosage radioimmunologique de la vaso-

pressine. La description des techniques d'obtention d'anticorps anti-vasopressine et de préparation de l'hormone marquée, ainsi que l'étude de leurs caractéristiques fera l'objet d'une grande partie de notre premier chapitre de Méthodologie. Dans cette partie, nous rapportons également les tests de contrôle du dosage que nous avons effectués, afin de nous assurer de la validité de la technique et d'en connaître ses limites. L'analyse statistique des résultats ainsi qu'une comparaison entre les mesures obtenues avec la méthode radioimmunologique et celles obtenues avec la méthode biologique démontrent que l'essai radioimmunologique possède les qualités de précision, de reproductibilité et de spécificité requises pour un dosage. Nous avons donc utilisé cette technique pour évaluer l'hormone antidiurétique dans les urines et dans les tissus nerveux des animaux expérimentaux. Malheureusement, la sensibilité du dosage était insuffisante pour permettre le dosage de l'ADH dans le plasma.

Nous avons exposé dans un troisième chapitre les résultats des recherches concernant le rôle des corticoïdes sur l'effet final de l'hormone antidiurétique. En fait, nous nous sommes demandée si les hormones surrénaliennes étaient capables d'influencer le mécanisme d'action du peptide neurohypophysaire. Il est maintenant bien établi que l'AMPcyclique est l'intermédiaire intracellulaire de l'action de l'hormone antidiurétique au niveau des tubules distaux et des canaux collecteurs du rein (BROWN et coll., 1963 ; GRANTHAM et BURG, 1966). Plus précisément, l'hormone fixée à son récepteur membranaire stimule l'adényl-cyclase qui permet la formation d'AMPcyclique à partir d'ATP : le nucléotide cyclique ainsi formé rend possible la réabsorption de l'eau. Nous nous sommes donc attachée à étudier l'effet de la surrénalectomie et des corticoïdes sur la stimulation de l'adényl-cyclase par la vasopressine. Nous avons, par la suite, recherché à préciser l'étape du mécanisme d'action soumis à l'influence des hormones surrénaliennes : on est, en effet, amené à se demander si la diminution de la stimulation maximale de l'adényl-cyclase vasopressine-dépendante observée après surrénalectomie est la conséquence d'une baisse de la capacité de fixation de l'hormone antidiurétique au niveau des sites récepteurs ou si l'absence de surrénales influence l'étape suivante "du couplage" qui conduit à l'activation de l'adényl-cyclase. L'effet des différents types d'hormones surrénaliennes (minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes) sur l'activité de l'adényl-cyclase sensible à l'hormone antidiurétique a été ensuite étudié chez le Rat surrénalectomisé permettant ainsi de déterminer la participation relative de l'un

ou l'autre des corticoïdes au niveau des différentes étapes du processus d'action de l'hormone antidiurétique. Cependant, il est difficile de donner à ces données biochimiques une interprétation physiologique. C'est ce que nous verrons dans un quatrième chapitre, dans lequel nous avons rapporté le bilan de l'excrétion hydroélectrolytique des animaux surrénalectomisés et traités avec différents corticoïdes.

CHAPITRE PREMIER

METHODOLOGIE

MÉTHODOLOGIE

Ce chapitre est consacré à l'étude et à la description des différentes techniques utilisées au cours de ce travail:

A - Dosage radioimmunologique de l'hormone antidiurétique.

B - Techniques biochimiques : détermination de l'activité enzymatique adényl-cyclasique rénale et mesure de la liaison de la vasopressine tritiée aux récepteurs rénaux.

Nous avons en outre précisé les conditions expérimentales de l'étude physiologique et indiqué les méthodes employées pour le dosage de substances auxquelles nous avons été amenée à nous intéresser.

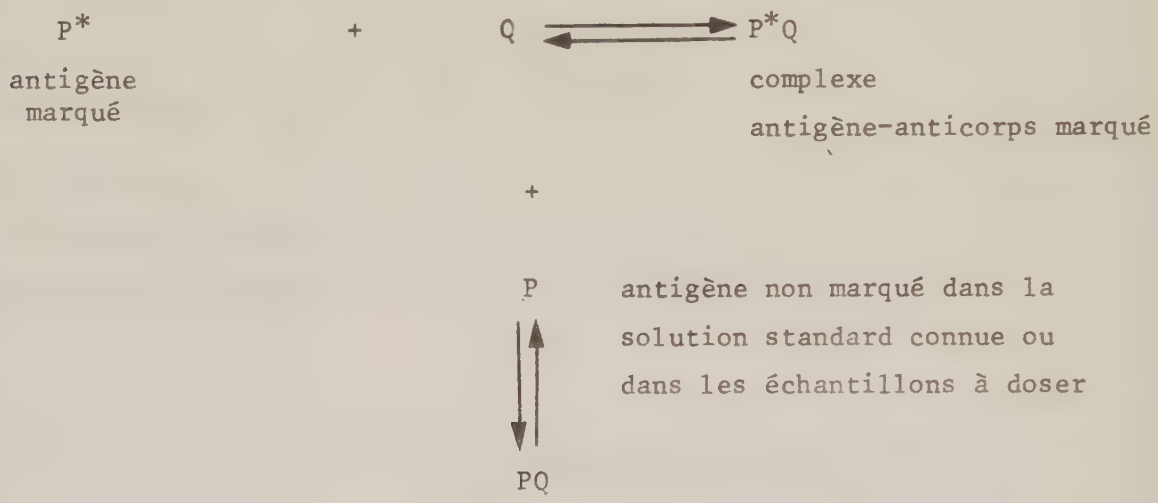
A - DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'HORMONE ANTIDIURÉTIQUE

1 - PRINCIPE

Le dosage radioimmunologique a été imaginé et utilisé pour la première fois en 1959 par BERSON et YALOW pour déterminer le taux d'insuline plasmatique circulante chez l'Homme. Dès 1956, ces auteurs avaient observé que, chez les sujets diabétiques traités à l'insuline, tout se passait comme si des anticorps liant l'hormone étaient présents dans le plasma des patients. Par la suite, ces chercheurs ont montré que lorsque des quantités croissantes d'insuline étaient ajoutées "in vitro" à un sérum provenant de ces malades, la fraction d'hormone liée aux gamma-globulines diminuait progressivement bien que la quantité absolue d'insuline fixée augmentât. Lorsque l'insuline marquée à l'iode 131 était employée, il se formait un complexe radioactif avec les gamma-globulines et l'addition d'insuline non marquée faisait baisser l'activité de ce complexe. Cette observation fut à l'origine de la technique de dosage de l'insuline employée par YALOW et BERSON.

La généralisation de cette technique à d'autres substances or-

ganiques a conduit à la méthode des dosages radioimmunologiques : la réaction de base du dosage met en présence un antigène marqué *P, un antigène non marqué P et un anticorps Q. Les antigènes *P et P se lient de manière compétitive à l'anticorps, pour aboutir après évolution de la réaction à l'équilibre réversible suivant :



A l'équilibre dynamique de la réaction, il existe entre les différentes concentrations une relation de type loi d'action de masse. Pour un mélange dans lequel sont fixés :

- d'une part, la concentration en anticorps $q = [Q + QP + P^*Q]$
- d'autre part, la concentration en antigène marqué $p = [^*PQ + ^*P]$

et que seule varie la concentration en antigène non marqué p, la loi d'action de masse montre que la concentration en antigène lié marqué $[P^*Q]$ décroît, lorsque la concentration $p = [P + PQ]$ en antigène non marqué augmente. A chaque concentration de p correspond un certain pourcentage d'hormone marquée liée : B/T (B/T = bound/total = $P^*Q/P^*Q + P^*$). Aussi, pour déterminer la quantité d'hormone dans un échantillon à doser, il suffit de comparer la réponse B/T relative à l'extrait inconnu à celle obtenue avec des solutions standards connues.

Cette méthode est, à l'heure actuelle, appliquée au dosage de très nombreuses hormones peptidiques et stéroïdiennes, et c'est en 1966 qu'ont été publiés par ROTH et coll., puis PERMUTT et coll., les premiers essais de

dosage de l'hormone antidiurétique (ADH).

Un tel procédé de dosage ne pourra être opérationnel que si l'on dispose d'une hormone marquée adéquate et d'un antisérum très spécifique. C'est pourquoi, après avoir exposé les différentes méthodes expérimentales employées au cours de la mise au point de la technique, nous nous sommes attachée à décrire les propriétés relatives à l'hormone marquée et aux anticorps utilisés. Ensuite, pour vérifier la qualité et la validité du dosage, nous avons évalué par voie statistique la précision des résultats obtenus et mesuré comparativement l'hormone antidiurétique dans un certain nombre d'extraits tissulaires et urinaires selon les deux techniques radioimmunologiques et biologiques.

2 - DESCRIPTION DES MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

a) PREPARATION ET PURIFICATION DE LA VASOPRESSINE MARQUEE

- Introduction

Pour la mise au point des techniques, nous avons préféré utiliser la lysine-vasopressine (LVP), hormone naturelle du Porc (FERGUSSON et HELLER, 1965) à l'arginine-vasopressine (AVP), bien que cette dernière soit celle à doser effectivement. En effet, l'AVP est d'obtention plus difficile et de conservation plus délicate, car elle dimérise facilement.

Le marquage de ces hormones est le plus souvent réalisé avec les isotopes ^{125}I ou ^{131}I car ils permettent d'obtenir des niveaux d'activité élevés. En ce qui concerne les peptides hormonaux, le carbone 14 ou le tritium ne peuvent servir, car même si une substitution complète de ces atomes était possible, l'activité spécifique théorique atteinte serait insuffisante. Jusqu'à présent le tritium n'a été utilisé que pour le dosage radioimmunologique des stéroïdes.

Malgré la plus grande radioactivité spécifique de l'isotope ^{131}I (125 mC/µg contre 18 mC/µg pour ^{125}I, lorsque ces isotopes sont fournis

sans entraîneur), nous avons préféré utiliser l'iode 125. En effet, si l'isotope ^{125}I peut être obtenu sans entraîneur, l'abondance isotopique de l'iode 131 ne dépasse pas 30 à 40 p. cent. D'autre part, la période de 2 mois de ^{125}I comparée à celle de 8 jours de l'isotope 131 permet une utilisation plus longue de l'hormone marquée à l'iode 125.

- Protocole de l'iodation de la lysine-vasopressine

L'iodure de sodium (2 mC de ^{125}I Na) en solution pH = 8 à 11, est fourni par le "Radiochemical Centre" d'Amersham. La solution dépourvue d'agents réducteurs a une activité de 80 - 140 mC/ml et la radioactivité spécifique de l'iodure de Na est en général supérieure à 14 mC/µg.

La technique employée est celle décrite par HUNTER et GREENWOOD (1962) qui utilisent comme agent oxydant la chloramine T.

Pour éviter les pertes, la réaction d'iodation est effectuée dans le flacon d'envoi.

Aux 2 mC ^{125}I Na contenus dans un volume de 20 µl, sont ajoutés successivement :

- 25 µl de tampon phosphate de sodium 0,5 M pH = 7,5.
- 5 à 8 µg de LVP dans un volume de 10 µl.
- 75,5 µg de chloramine T dans 20 µl de tampon phosphate de sodium 0,05 M pH = 7,5.

Le mélange est agité durant 30 secondes et la réaction est arrêtée par addition de 240 µg de métabisulfite de sodium dans 100 µl de tampon phosphate de sodium 0,05 M pH = 7,5.

200 µl de ce même tampon sont ajoutés au mélange réactif. L'ensemble est immédiatement transféré sur une colonne de DEAE cellulose (hauteur de 10 cm, diamètre de 1 cm). La vasopressine est éluée avec une solution tampon d'acétate d'ammonium 0,02 M, pH = 5,4 à un débit de 0,4 ml/mn à 4°C. L'hormone marquée est concentrée dans le premier pic radioactif qui sort de la colonne (6,3 ml). L'iode qui n'a pas réagi est retenue par la résine (Figure 1).

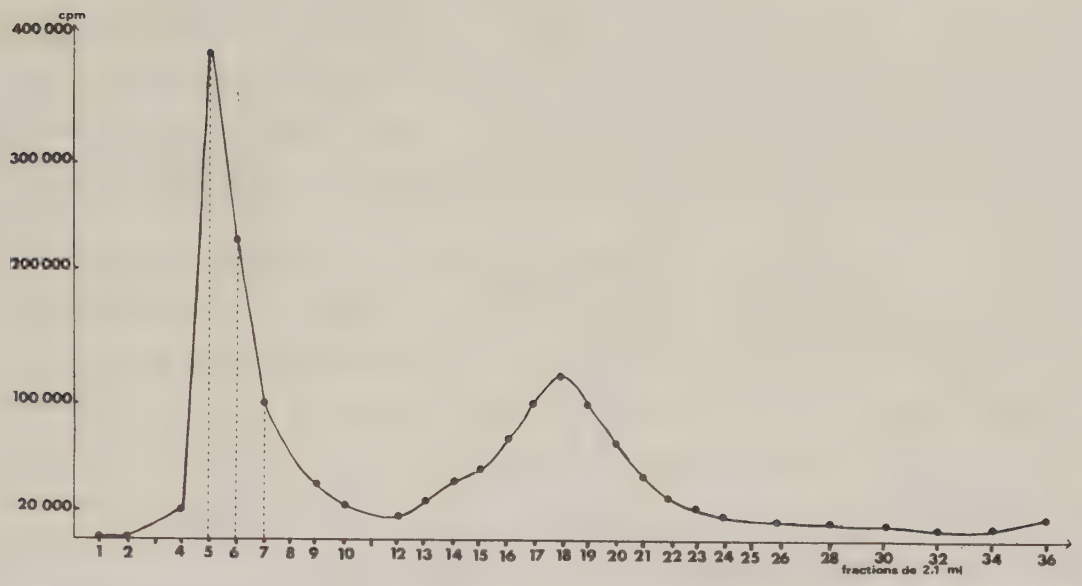


FIGURE 1 *Chromatographie sur colonne de DEAE cellulose de ^{125}I-LVP*

Après iodation de la lysine-vasopressine, le mélange réactif est immédiatement transféré sur la colonne (hauteur = 10 cm, diamètre = 1 cm). L'hormone marquée éluée avec un tampon acétate d'ammonium 0,02 M, pH = 5,4 est concentrée dans le premier pic radioactif, alors que les ions iodures sont retenus par la résine.

- Purification de la LVP iodée par filtration sur gel de Sephadex G 15

1 ml de la solution de ^{125}I-LVP provenant de la colonne de DEAE cellulose est déposé sur une colonne de Séphadex G 15 (hauteur 30 cm, diamètre 0,9 cm), équilibrée avec du tampon formiate d'ammonium 0,02 M, pH = 4,5 L'éluat est collecté par fractions de 1,3 ml, le débit d'élution étant de 0,3 ml/mn. Toutes les opérations s'effectuent en chambre froide à 4°C.

Par rapport à la LVP non iodée, la vasopressine marquée à l'iode 125 est plus efficacement retenue sur la colonne : le sommet du pic d'élution de ^{125}I-LVP n'apparaît qu'au tube 48, 20 tubes après celui de la LVP non marquée (Figure 2). Les fractions 44-54 contenant la LVP radioiodée sont collectées en vue du dosage. Nous avons en outre montré, en évaluant l'activité antidiurétique des différentes fractions, qu'après filtration de 10 IU de LVP appliquée seule sur la colonne, seulement 2,5 p. cent de la vasopressine chromatographiée ont été retrouvés dans les fractions 44-54 correspondant au maximum du pic ^{125}I-LVP (Tableau I).

La filtration sur gel de Séphadex G 15 permet donc de séparer la LVP non iodée de la LVP iodée ; par ce procédé il est possible d'obtenir un lot de lysine-vasopressine marquée à l'iode 125 sans contamination notable par de la LVP non marquée.

Cette technique de filtration sur gel de Séphadex G 15 a été également employée par LEGROS et FRANCHIMONT (1971) pour purifier l'hormone iodée après marquage.

TABLEAU I *Evaluation de l'activité antidiurétique des différentes fractions recueillies après passage sur gel de Séphadex G 15 de 10 IU de lysine-vasopressine*

Numéro des fractions (1,3 ml)	20	25	30	35	40	45	50	55
LVP : mU/1,3 ml	52,2	572	585	182	45,5	27,3	16,9	12,7

L'activité antidiurétique totale évaluée dans les fractions 44-54 rassemblées correspond à 247 mU soit 2,5 p. cent de la quantité chromatographiée.

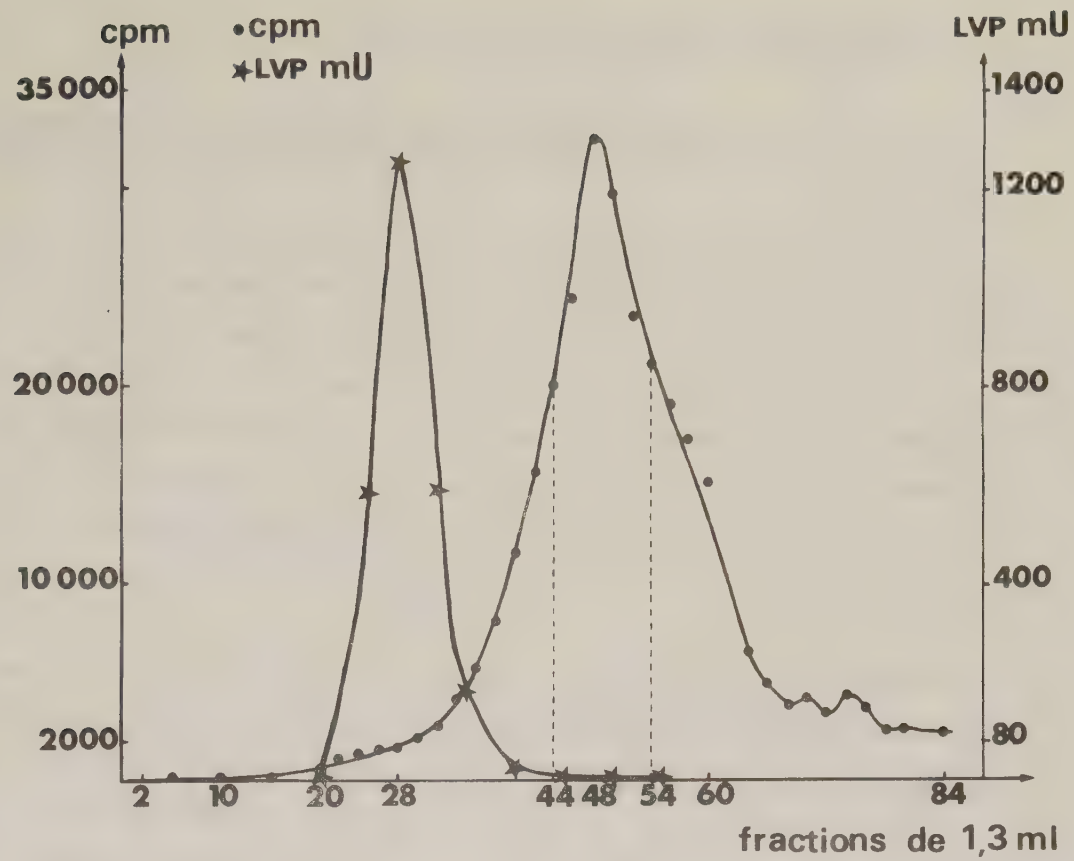


FIGURE 2 — *Comparaison de la filtration sur gel de Séphadex G 15 de la lysine-vasopressine radioiodée (^{125}I-LVP, ●) et de lysine-vasopressine de synthèse (LVP, ★)*

Sur une même colonne de Séphadex G 15 (30 cm de hauteur, 0,9 cm de diamètre) ont été filtrées successivement de la lysine-vasopressine radioiodée et 10 unités de lysine-vasopressine de synthèse.

Au cours d'une première expérience, 1 ml de ^{125}I-LVP provenant de la colonne de DEAE-cellulose a été filtré sur la colonne. Le sommet du pic d'élution de la LVP iodée apparaît alors au tube 48.

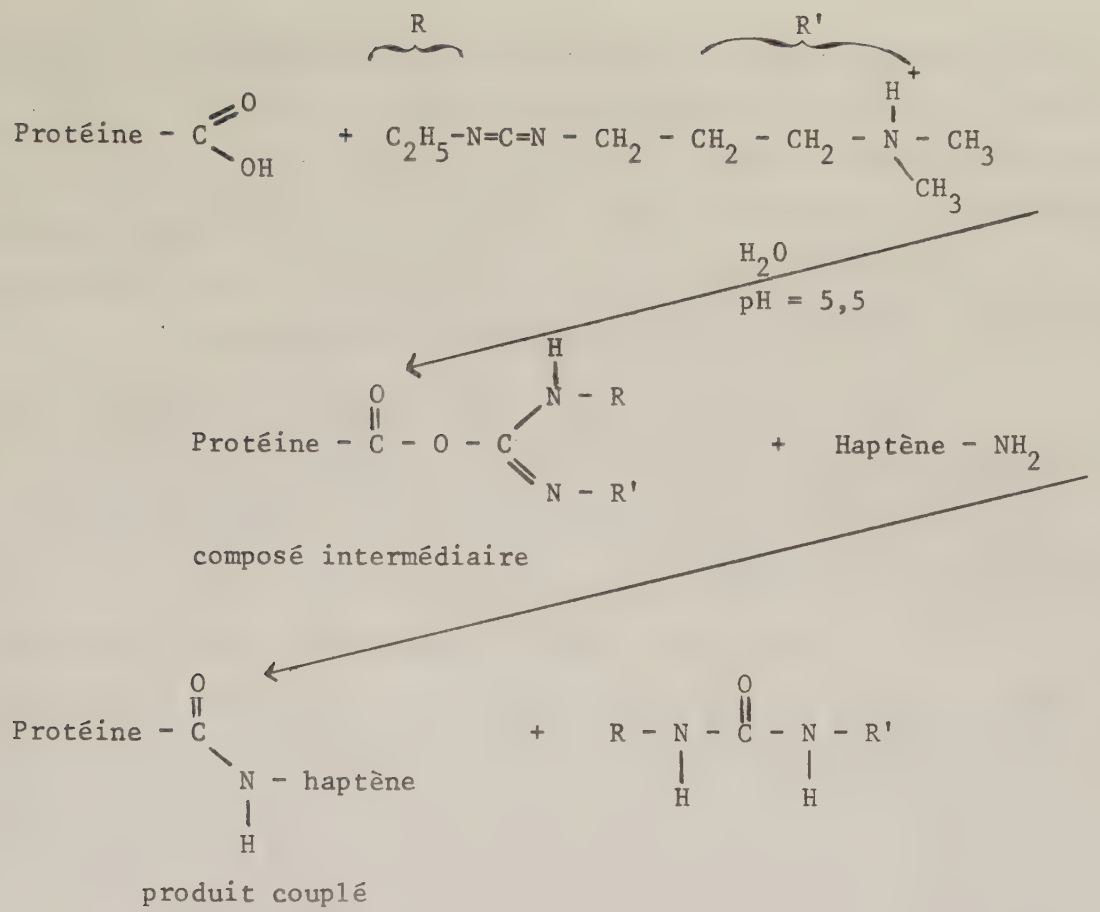
Au cours d'une seconde expérimentation, 10 unités de LVP de synthèse ont été chromatographiées et l'hormone a été évaluée dans les fractions 20 à 54 selon la technique biologique (mesure de l'antidiurèse du Rat maintenu en surcharge hydrique constante). Le sommet du pic d'élution de l'hormone apparaît au tube 28, 20 tubes avant celui de la LVP iodée. Lorsque, dans ces conditions, les fractions 44 à 54 sont rassemblées, elle ne renferment que 2,5 p. cent des 10 unités de lysine-vasopressine appliquées sur la colonne.

b) OBTENTION D'IMMUNSERUMS ANTI-LVP

- Conjugaison de la vasopressine à la sérum-albumine de Lapin

L'immunogénicité d'une substance dépend à la fois de sa taille et de sa composition chimique. La plupart des polypeptides de poids moléculaire élevé (PM = 10 000) sont des immunogènes puissants : mais d'autres composés, tels que les stéroïdes et les petits peptides (PM = 1000 à 5000) développent plus difficilement chez l'animal une réponse immunitaire. Cependant, leur pouvoir immunogène peut être augmenté lorsqu'on les couple de manière covalente à des protéines de grande dimension. Des procédés chimiques variés peuvent être employés pour lier de telles substances (considérées comme des haptènes) à une molécule de protéine (NISONOFF et coll., 1967). Divers travaux concernant la spécificité des anticorps obtenus en employant comme antigène un complexe haptène-protéine ont montré que la spécificité antigénique est principalement dirigée vers la partie de la molécule la plus éloignée du point d'attache à la protéine (PARKER et coll., 1971) ; ainsi, l'injection, à des animaux, de ce type de conjugué permet d'obtenir des anticorps spécifiques de l'haptène. Les animaux immunisés peuvent par ailleurs développer des anticorps vis-à-vis de la protéine utilisée pour le couplage ; aussi est-il préférable d'employer une protéine homologue (telle la sérum-albumine de Lapin quand il s'agit d'immuniser des Lapins).

La conjugaison de l'hormone antidiurétique avec la sérum-albumine implique la formation d'une liaison de type CO-NH entre les deux composés. L'établissement de cette liaison ne peut se réaliser directement : il est nécessaire d'employer un agent activant tel que la carbodiimide (1-éthyl-3-(3-diméthyl-aminopropyl)-carbodiimide). Les carbodiimides sont capables d'activer les groupements carboxyles de la protéine. La réaction de conjugaison s'effectue en deux étapes selon le schéma de GOODFRIEND et LEVINE (1964) : il y a d'abord formation d'un composé intermédiaire protéine-carbodiimide, ensuite l'activation du groupement carboxyle permet la formation du complexe haptène-protéine par l'intermédiaire d'une liaison amide.



Le protocole employé est celui que GOCKE et coll. (1969) utilisent pour la conjugaison d'angiotensine à la sérum-albumine. A 325 unités (1,2 mg) de lysine-vasopressine dissoutes dans 0,5 ml d'eau distillée, on ajoute 6 mg de sérum-albumine de lapin, de manière à ce que le rapport moléculaire LVP/sérum-albumine soit égal à 1/1 . Après addition de 100 mg de carbodiimide (CDI) dans 0,25 ml d'eau distillée, le mélange est doucement agité à température ambiante durant 30 minutes. Le volume est alors ajusté à 2 ml avec de l'eau distillée, puis dialysé (tube à dialyse Visking N°8) contre 7 litres d'eau distillée à 4°C pendant 48 heures. Ni la mesure de l'effet pressif, ni celle de l'effet antidiurétique du dialysat ne permettent de mettre en évidence de lysine-vasopressine libre. Le rendement de la réaction de conjugaison est supérieure à 90 p. cent.

- Procédé d'immunisation

Pour favoriser la production d'anticorps, le complexe vasopressine-albumine de lapin est injecté en présence d'adjuvant complet de Freund.

En formant une émulsion stable avec la solution d'antigène, l'adjuvant minimise les effets physiologiques de l'hormone et évite la dégradation rapide de l'immunogène par les enzymes protéolytiques. De plus, ce mélange possède de hauts pouvoirs antigéniques ; il facilite la phagocytose de l'antigène par les macrophages, provoque la formation de lésions granulomateuses qui sont des foyers de formation d'anticorps et enfin stimule la multiplication des cellules lymphoïdes immunologiquement compétentes.

Le Lapin a été choisi comme animal à immuniser en raison de la grande quantité de sérum qu'il est susceptible de fournir, de la possibilité et de la facilité d'effectuer de nombreux prélévements sanguins, et de sa plus grande résistance.

Au cours de la première immunisation, 0,5 ml du complexe contenant 100 IU de LVP sont émulsionnés avec un volume égal d'adjuvant complet de Freund. Environ 0,4 ml du mélange sont injectés directement dans la rate d'un lapin de 2 à 3 kg, après anesthésie au pentobarbital à 6 p. cent (20 mg/kg). Les 0,6 ml restants sont administrés dans les coussinets plantaires et au niveau des ganglions inguinaux. Par la suite, des injections intrapéritonéales, intramusculaires et sous-cutanées de la combinaison complexe-adjuvant de Freund renfermant 100 IU de LVP sont répétés de manière hebdomadaire durant six semaines. En général, l'immunisation est entretenue par administration, à intervalles réguliers de 3 semaines, de 100 à 150 IU de LVP conjuguées et émulsionnées dans de l'adjuvant de Freund.

Le prélévement sanguin permettant de suivre l'évolution de la formation d'anticorps circulants est effectué entre le 6ème et le 8ème jour qui suit la dernière injection.

c) TECHNIQUES D'EXTRACTION DU PEPTIDE

Avant le dosage, l'hormone antidiurétique est extraite soit des tissus nerveux, soit des urines ou du plasma.

L'extraction de l'ADH à partir des tissus nerveux est réalisée selon le procédé d'AMATRUDA et coll. (1963). Immédiatement après le sacrifice de l'animal, hypophyse, noyaux supra-optiques, éminence médiane sont

prélevés et immédiatement plongés dans de l'acétone froide. Après quelques heures, la solution est changée et les différents tissus sont à nouveau placés dans un grand volume d'acétone, pendant 24 heures à 4° C. Ils sont ensuite déshydratés sous vide en présence d'anhydride phosphorique. Les hypophyses sont alors disséquées ; le lobe intermédiaire facilement séparé de l'adéno-hypophyse adhère au lobe nerveux qui doit en être soigneusement débarrassé. Les lobes nerveux sont pesés, à 0,5 µg près, à l'aide d'une électro-balance CAHN-GRAM. Les différents tissus nerveux sont alors broyés à l'aide d'un Potter dans 0,5 ml d'acide acétique à 0,25 p. cent. Après centrifugation de la suspension à 4° C durant 30 minutes à une vitesse de 4000 g, le surnageant est prélevé, puis conservé au congélateur à - 30° C jusqu'au moment du dosage. Dans ces conditions, de tels extraits ont put être gardés un an sans perte d'activité.

La vasopressine a été extraite des urines selon la technique de MORAN et coll. (1964), légèrement modifiée. Les urines ajustées à pH 4,5 sont chromatographiées sur colonne d'amberlite C.G. 50, Type II (1,5 cm de diamètre, 2 cm de hauteur). La résine est au préalable mise sous forme H^+ selon le procédé d'HIRS et coll. (1953). Après passage des urines sur la colonne, l'amberlite subit d'abord un lavage avec 25 ml d'eau distillée, ajustée à pH 4,5, puis avec 25 ml d'éthanol à 50 p. cent. L'élution de l'hormone s'effectue avec 50 ml d'alcool éthylique à 75 p. cent, ajusté à pH 2 avec de l'acide chlorhydrique. Les éluats recueillis dans des ballons siliconés sont évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. Pour éliminer les traces d'acide, le résidu repris avec 5 ml d'eau distillée est mis à nouveau à évaporer. L'extrait est conservé à sec à - 30°C jusqu'au moment du dosage où il est mis en solution dans 4 ml de tampon phosphate de sodium 0,01 M pH = 7,5, NaCl 0,15 M. Le pH de ces solutions est contrôlé et ajusté, si nécessaire, à pH 7,5, avec une solution de soude 0,1 N.

Le rendement de l'extraction a été mesuré à l'aide de l'hormone marquée à l'iode 125 et de lysine-vasopressine de synthèse. La LVP marquée à l'iode 125, diluée dans 10 ml de sérum physiologique à pH = 4,5, subit le traitement décrit ci-dessus. La radioactivité retrouvée à la fin de l'expérience est exprimée en pourcentage de la radioactivité appliquée sur la colonne. Le rendement se situe alors à 69,9 p. cent $\pm$ 2,4 (n = 36). Dans le second cas, 1 ou 10 mU de LVP sont ajoutées à 10 ml d'urines, ajustées à pH = 4,5, de sujets présentant un diabète insipide d'origine centrale. Ex-

traction et dosage s'effectuent dans des conditions analogues à celles des urines. Le résultat donne alors un rendement de 63,3 p. cent ± 5,2 (n = 12).

A partir des plasmas, l'extraction de l'hormone s'effectue selon la méthode décrite par EDWARDS et coll. (1970) qui implique l'adsorption de la vasopressine sur des grains de verre Spherosil X·OA. Les plasmas provenant de deux animaux sont rassemblés de manière à pouvoir disposer d'un volume suffisant (4 à 5 ml) pour l'extraction. Toutes les opérations sont exécutées dans un tube à centrifuger conique. Aux plasmas acidifiés par de l'acide chlorhydrique 1 N (1 ml pour 5 ml de plasma, le pH étant alors égal à 1,3), on ajoute 100 mg de Sphérosil X OA. Un petit barreau aimanté permet une agitation continue de la suspension durant 10 minutes. Après avoir retiré et rincé l'aimant, on centrifuge à froid 5 minutes. Le surnageant est écarté, le Sphérosil X OA est lavé successivement avec 2 ml d'HCl N et 2 ml d'eau distillée. L'élution de l'hormone antidiurétique s'effectue par une solution d'acétone à 80 p. cent, les grains de verre mis en suspension dans 2 ml de mélange eau-acétone sont agités 10 minutes, ensuite centrifugés. Le surnageant conservé, le culot est soumis deux fois encore au processus d'élution. Les surnageants réunis sont concentrés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait est repris deux fois avec 2,5 ml d'eau distillée mis dans un ballon siliconé de 25 ml et évaporé à nouveau. Cette dernière manipulation a pour but d'éliminer, par l'évaporation, les dernières traces d'acétone et surtout de minimiser les pertes lors de la mise en solution de l'extrait dans un petit volume (2 ml), par l'emploi de ballons siliconés. On dilue l'extrait sec obtenu dans 2 ml de tampon phosphate de sodium 0,01 M NaCl 0,15 M, lysozyme 300 mg p. cent (pH = 7,5) pour le dosage radioimmunologique ou dans 2 ml de sérum physiologique en vue du dosage biologique. Avant tout dosage, le pH est mesuré et ajusté à 7,5, si nécessaire.

Le rendement de la méthode d'extration de la vasopressine à part du plasma a été mesuré à l'aide de l'hormone marquée à l'iode 125. Au début de l'extraction, on ajoute 100 000 cpm environ de ^{125}I-LVP à 5 ml de plasma. Exprimé en pourcentage de la radioactivité retrouvée à la fin de l'expérienc le rendement se situe alros à 65,5 p. cent ± 1,2 (n = 45). Quand 1 mU de LVP est additionnée au prélèvement plasmatique, le rendement déterminé par la méthode biologique est de 56,5 p. cent ± 5,0 (n = 6) en moyenne. Lorsque l'échantillon est destiné au dosage biologique, le pourcentage d'hormone extraite est chaque fois estimé à l'aide du peptide radioiodé qui ne possède

plus de pouvoir antidiurétique. Ceci permet donc de corriger la valeur de la concentration hormonale de chaque plasma par le rendement de sa propre extraction.

d) PROTOCOLE DU DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE

- Réactifs utilisés

Tampon : la réaction s'effectue dans un milieu phosphate de sodium 0,01 M, pH = 7,5, contenant du chlorure de sodium à 0,15 M et du lysozyme à une concentration de 300 mg pour 100 ml.

Vasopressine marquée : la lysine vasopressine radioiodée, conservée à 4°C, est diluée juste avant l'emploi dans le tampon précité de manière à avoir 8000 à 10 000 cpm dans 50 µl, ce qui correspond environ à 2,5 µU/50 µl (soit à 0,2 nM/l).

Lysine vasopressine de synthèse (Sandoz) : chaque ampoule de 1 ml à une concentration de 10 U/ml est conservée au réfrigérateur à 4°C. Lorsque l'ampoule est ouverte, des fractions de 100 µl sont distribuées dans des tubes en plastique et maintenus congelés à - 30°C jusqu'à l'emploi. Les solutions finales de concentrations allant de 10 µU/ml à 500 µU/ml ou de 50 µU/ml à 1000 µU/ml sont préparées lors de chaque expérience dans du tampon phosphate.

Anticorps anti-LVP : les immunsérums conservés au congélateur à - 30° C par fractions de 50 µl sont dilués juste avant l'emploi par du tampon phosphate de sodium 0,01 M, pH = 7,5, lysozyme 300 mg pour 100 ml. La dilution d'immunsérum nécessaire pour lier 50 p. cent d'hormone marquée est déterminée au cours d'une expérience préliminaire pour chaque nouvelle préparation de vasopressine marquée.

Charbon Norit A (Sigma) : le charbon non traité est lavé au préalable avec HCl et très soigneusement rincé à l'eau distillée de manière à éliminer toute trace d'acide. La solution préparée dans l'eau distillée est à 10 p. cent et conservée au réfrigérateur.

Dextran T_{70} (Pharmacia) : solution à 1 p. cent.

- Choix de la dilution de l'immunsérum

BERSON et YALOW (1964), ont démontré que le maximum de sensibilité est obtenu lorsque l'immunsérum est employé à une dilution telle que la fraction d'hormone liée à l'anticorps (en absence d'hormone non marquée) est égale à 0,33, c'est-à-dire que le rapport hormoné liée/hormone libre = 0, Les auteurs montrent que lorsque le rapport est égal à 1,5, la sensibilité diminue très faiblement, mais qu'elle n'est plus que de moitié lorsque le rapport atteint une valeur de 2.

En ce qui nous concerne, nous avons constaté, par expérience, que le maximum de sensibilité était obtenu lorsque le pourcentage d'hormone marquée liée à l'anticorps était égal à 50 p. cent ± 10 p. cent. Pour déterminer ce pourcentage, l'antisérum à différentes dilutions (d = 0 à d = 1/10 000 au 1/100 000) est mis à incuber durant 24 heures à 4°C dans 0,5 ml de tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,15 M, lysozyme 300 mg pour 100 ml qui contient une quantité constante de vasopressine marquée (8000 à 10 000 cpm).

Dans ces conditions, les anticorps anti-LVP fixent l'hormone marquée : aux faibles dilutions de l'antisérum, la presque totalité de la radioactivité est liée au complexe. Pour des dilutions croissantes, le pourcentage d'hormone radioactive fixée diminue ; il est alors facile de déterminer graphiquement la dilution d'immunsérum pour laquelle 50 p. cent de l'hormone marquée sont liés aux anticorps (Figure 3).

- Mélange réactif

Les différents réactifs sont maintenus au froid et la réaction s'effectue dans des tubes en plastique placés dans un bac à glace.

Successivement sont ajoutés :

. 300 µl de tampon phosphate de sodium 0,01 M, pH = 7,5, NaCl 0,15 M, contenant 300 mg pour 100 ml de lysozyme.

. 100 µl de l'extrait inconnu à doser (à trois dilutions différentes) ou 100 µl de solution standard de LVP à des dilutions allant de 10 µU/ml à 500 µU/ml ou de 50 µU/ml à 1000 µU/ml pour la courbe étalon.

. 50 µl de ^{125}I-LVP (8000 à 10 000 cpm).

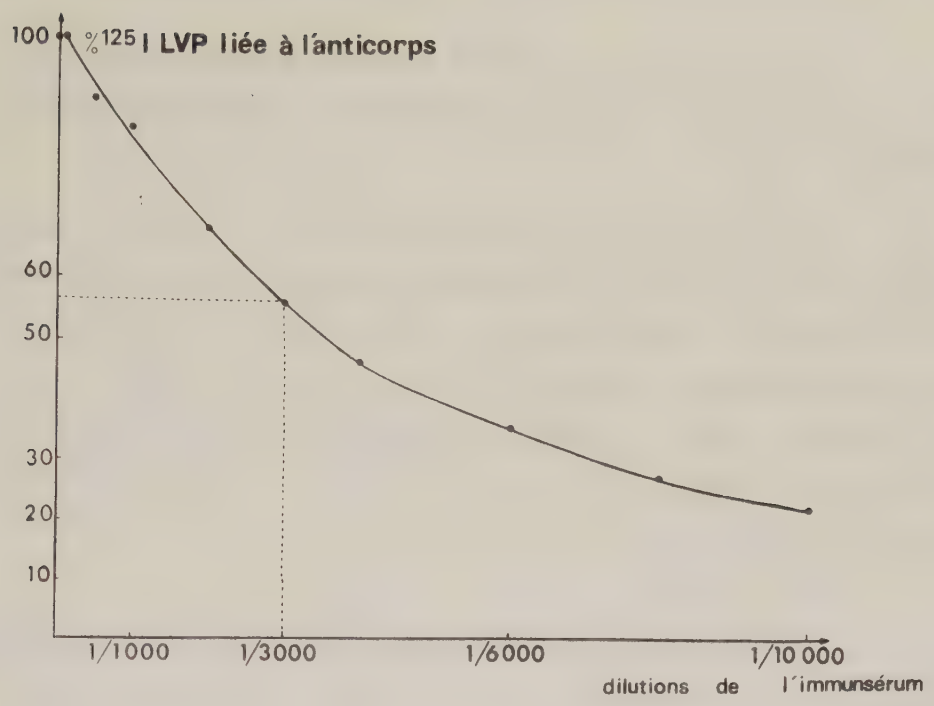


FIGURE 3 *Courbe de dilution d'un immunsérum*

50 µl d'un immusérum à différentes dilutions sont mis à incuber 24 heures, à 4°C, dans 0,5 ml de tampon phosphate de sodium 0,01 M, pH 7,5, qui renferment du chlorure de sodium 0,15 M et du lysozyme à 300 mg pour 100 ml, en présence d'une quantité constante de vasopressine marquée (3 µU environ, soit 8000 à 10 000 cpm).

La dilution de l'immunsérum employé pour le dosage correspond à la dilution qui permet une fixation de 50 ± 10 p. cent de l'hormone marquée à l'anticorps.

Chaque point a été déterminé par deux mesures expérimentales indépendantes.

. 50 µl d'antisérum anti-LVP dilué de manière à avoir en l'absence de LVP froide 50 p. cent de l'hormone marquée liée à l'anticorps.

Chaque tube est agité, recouvert de Parafilm et mis à incuber à 4°C pendant 18 à 20 heures, temps au cours duquel se formera le complexe antigène-anticorps.

Le temps d'incubation a été choisi au cours d'expériences précédentes, effectuées dans les conditions habituelles, en absence d'hormone non marquée (Figure 4). On remarque que le pourcentage d'hormone marquée liée à l'anticorps augmente rapidement au cours des trois premières heures, puis très lentement, pour atteindre une valeur à peu près constante après 17 heures. Des incubations plus prolongées de 24, 48 et 72 heures ne modifient pas la réaction.

- Séparation de l'hormone libre du complexe vasopressine-anticorps

Une suspension aqueuse de charbon à 10 p. cent est préparée et mélangée en partie égale à une solution de dextran T_{70}. 0,1 ml de la suspension sont ajoutés à chaque tube. Ce mélange dextran-charbon, en excès par rapport à la lysine-vasopressine, a la propriété de fixer la LVP libre dans le milieu. Les tubes sont immédiatement agités et mis à centrifuger à 4°C pendant 10 minutes, à une vitesse de 4000 g. Des aliquots de 300 µl du surnageant sont prélevés à l'aide d'une micropipette à constriction "Pedersen" et mis dans des tubes pour y être comptés.

A chaque expérience, des tubes contrôles sans anticorps sont préparés ; la radioactivité mesurée dans les 300 µl prélevés est inférieure à 3 p. cent de la radioactivité totale.

Des tubes de référence auxquels on ajoute 100 µl de tampon au lieu de 100 µl de charbon sont aussi préparés à chaque dosage.

e) DOSAGE BIOLOGIQUE DE L'HORMONE ANTIDIURETIQUE

Malgré le caractère complexe et mal commode de sa mise en oeuvre, le dosage biologique a été utilisé pour l'étude des propriétés de l'hormone radioiodée et pour la vérification de la validité du dosage radioimmunologique proposé.

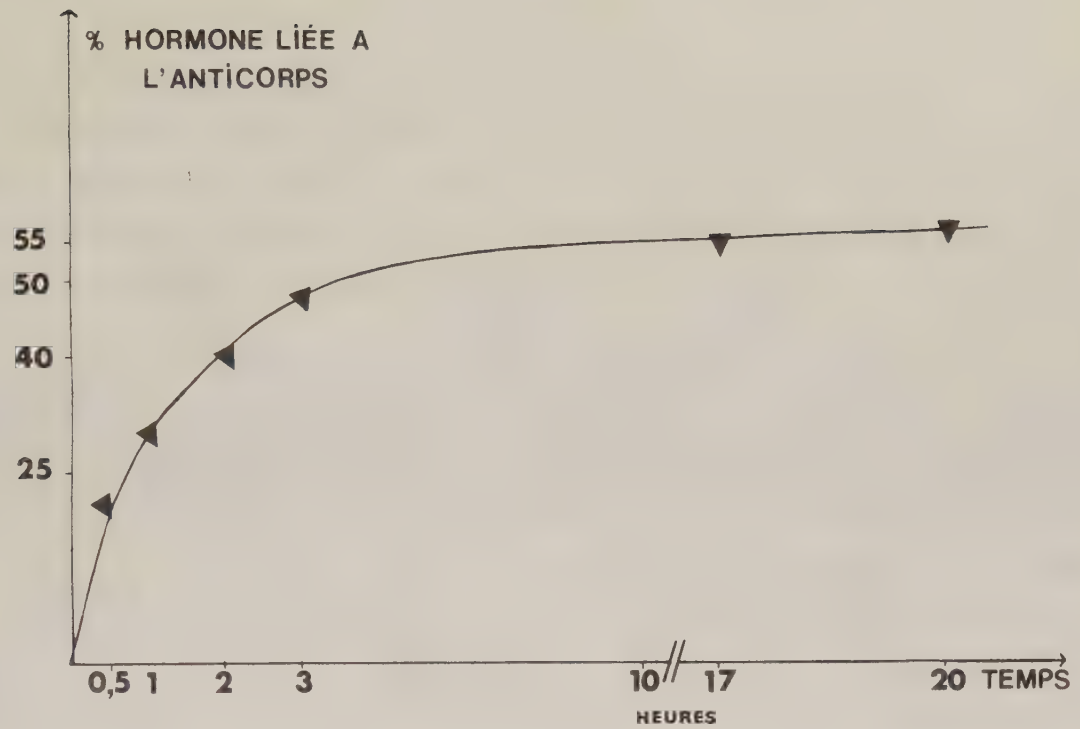


FIGURE 4 — *Evolution en fonction du temps de la réaction antigène-anticorps*

La réaction s'effectue à 4°C dans un volume final de 0,5 ml renfermant une quantité constante de ^{125}I-LVP (10 000 cpm) et d'anticorps (à une dilution de 1/3000).

- Préparation des animaux

La technique employée est celle décrite par JEFFERS et coll. (1942), mise au point au laboratoire par CUILLIER (1967) et AVELANGE (1968). Cette technique utilise comme animal réactif le Rat en surcharge hydrique, anesthésié à l'éthanol. Les animaux sont des rats femelles Sprague-Dawley fournis par le Centre d'Elevage des Oncins à Saint-Germain-sur-l'Arbresle (69).

Les rats pesant 150 à 200 g sont gavés une première fois avec une solution d'eau et d'alcool à 12 p. cent mélangés à volume égal ; la quantité administrée correspond à 5 p. cent du poids corporel de l'animal. Quarante cinq minutes plus tard, on recommence l'opération avec une quantité égale à 3 p. cent du poids corporel. Après 5 à 10 minutes, lorsque la narcose est suffisamment profonde, on entreprend la préparation chirurgicale de l'animal. Le rat est trachéomisé, la veine jugulaire est cathétérisée, une sonde vésicale est ensuite mise en place par cystotomie. Les plaies sont soigneusement suturées et l'animal est laissé reposant sur sa face ventrale. Lorsque l'urine apparaît à l'extrêmité de la sonde vésicale, celle-ci est reliée par l'intermédiaire d'un tube en polyéthylène souple à deux flacons de 500 ml placés en série et remplis entièrement par une solution contenant dans l'eau bouillie 50 p. cent d'alcool et 0,5 p. cent de NaCl. Le trop plein du flacon s'écoule vers un compte gouttes par un tube de plastique dont l'extrêmité se termine par une aiguille. Chaque goutte formée à l'extrêmité de l'aiguille tombe sur un contacteur qui, par l'intermédiaire d'un relais, commande simultanément un compteur enregistreur totaliseur (type appareil de THORP) permettant l'enregistrement graphique de la diurèse (Figure 5) et un compteur numérique avec remise à zéro.

Enfin, pour maintenir une charge hydrique constante, nous avons, selon le procédé de GHARIB (1967), perfusé l'animal à un débit moyen de 0,10 ml/mn, avec une solution contenant 0,3 p. cent de NaCl, 1,67 p. cent de glucose et 1,2 p. cent d'éthanol.

- Conduite du dosage

Le dosage ne peut être effectué que lorsque la diurèse est

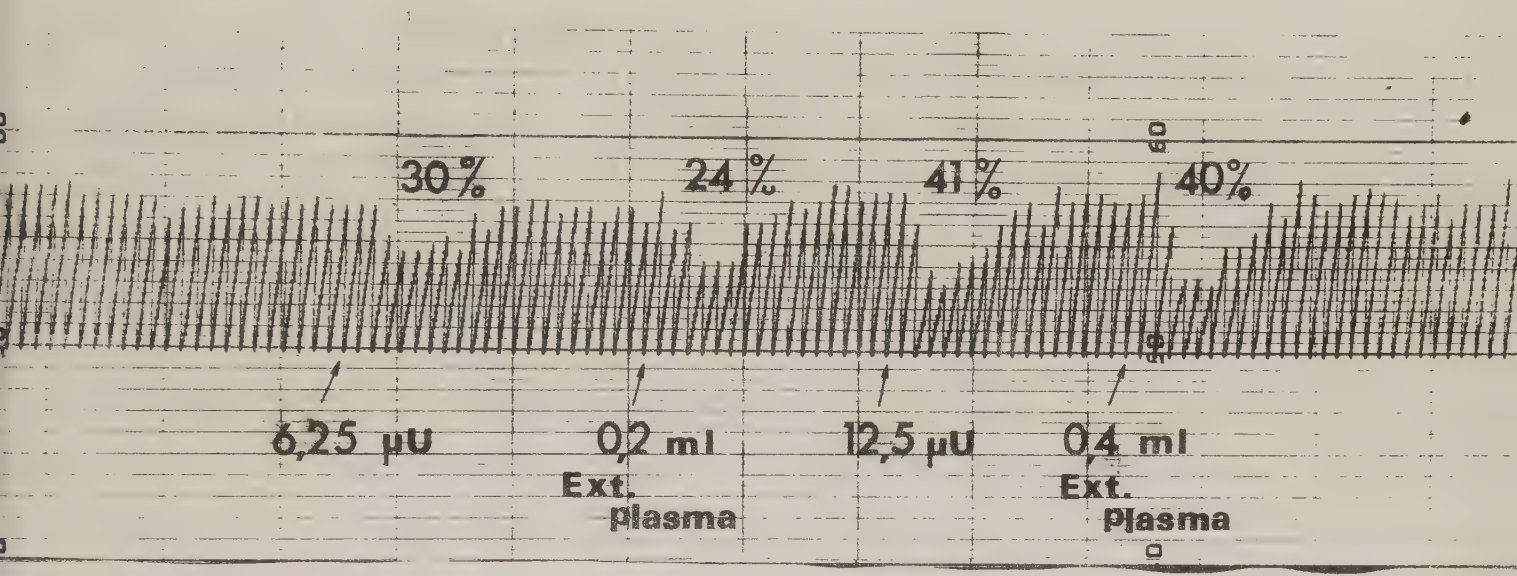


FIGURE 5 *Tracé graphique de l'enregistrement de la diurèse obtenue à l'aide d'un compteur enregistreur totaliseur (Type appareil de THORP)*

Le stylet inscripteur s'élève d'un cran à chaque goutte et tombe régulièrement toutes les minutes. L'antidiurèse est déterminée en mesurant le nombre de gouttes manquant au cours de la période comprise entre la 2ème et 8ème minute qui suit l'injection. Elle est exprimée en pourcentage par rapport à la diurèse de base, appréciée sur les 6 minutes précédant l'essai biologique.

stable et supérieure à 8 gouttes/mn. On emploie "un essai à quatre points", chaque rat recevant deux doses standard et deux doses de l'extrait de concentration inconnue, ces doses étant dans le même rapport 1/2 (Figure 5). Les solutions standard employées sont préparées à partir de solutions mères de lysine-vasopressine de synthèse (Sandoz) à 10 U/ml. Standard et extraits sont injectés dans le cathéter mis en place dans la veine jugulaire. Pour cela, la perfusion est interrompue quelques instants ; l'injection terminée, elle est immédiatement réinstallée, le perfusat permettant de laver les espaces morts constitués par l'aiguille et le cathéter. La réponse antidiurétique est exprimée en pourcentage de la réduction de la diurèse en prenant comme référence la diurèse des 6 minutes précédant l'injection et celle de la 2ème à la 8ème minute après l'injection. Il est alors possible de tracer les courbes "effet-dose" se rapportant à la solution étalon et à l'échantillon inconnu. Représentées sur papier semi-logarithmique, ces courbes sont des droites parallèles ; le parallèlisme entre ces deux droites constitue un des critères de spécificité du dosage (Figure 6).

La sensibilité du dosage varie d'une préparation à l'autre. La concentration en hormone antidiurétique du sang périphérique étant faible, on ne pourra utiliser pour doser les extraits plasmatiques que des préparations capables de détecter environ 10 µU de vasopressine. En outre, pour déceler la présence d'hormone dans les extraits à doser, on est parfois obligé d'injecter à l'animal réactif des volumes allant de 0,5 ml à 1 ml d'extrait. Dans ce cas, il est nécessaire de s'assurer que le volume injecté ne perturbe pas la réponse antidiurétique : l'extrait à doser et la solution standard devront alors être injectés sous un même volume.

Comme nous l'avons vu, les processus d'extraction sont succints et l'extrait risque parfois de contenir des impuretés susceptibles de provoquer une antidiurèse non spécifique. Dans le but de vérifier que l'effet observé est bien dû à l'hormone antidiurétique, nous procédons à une contre épreuve en inactivant la vasopressine par le thioglycolate de sodium. La solution de thioglycolate de sodium 0,1 M est préparée juste avant l'emploi à partir de bicarbonate de sodium et d'acide thioglycolique.

Le thioglycolate de sodium est alors ajouté à la solution standard et à l'extrait à doser de manière à avoir une concentration finale de 0,01 M. Le mélange est incubé deux heures à température ambiante, puis in-

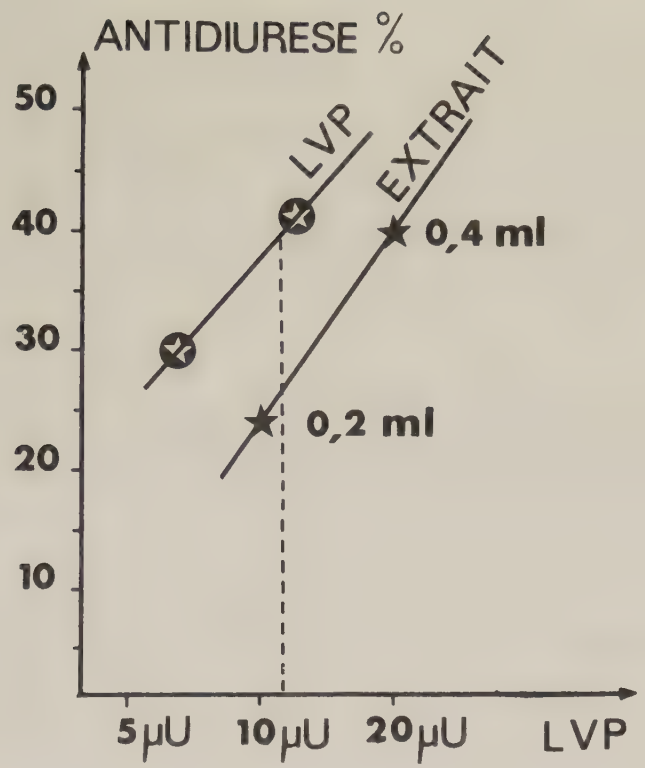


FIGURE 6 *Courbe effets-doses*

Pour chacune des solutions (étalon et inconnue) on réalise deux essais, dans un rapport de concentration égal à 1/2. Le report des points en coordonnées semi-logarithmiques permet de tracer des droites qui sont approximativement parallèles.

jecté par la voie intraveineuse. Lorsque l'activité antidiurétique de l'échantillon est due uniquement à l'hormone antidiurétique, on n'observe plus d'effet sur la diurèse. Si une réponse antidiurétique subsiste, elle est soustraite de l'effet total après avoir vérifié l'activité inhibitrice du thioglycolate sur la lysine-vasopressine standard.

3 - PROPRIÉTÉS DE L'HORMONE MARQUÉE

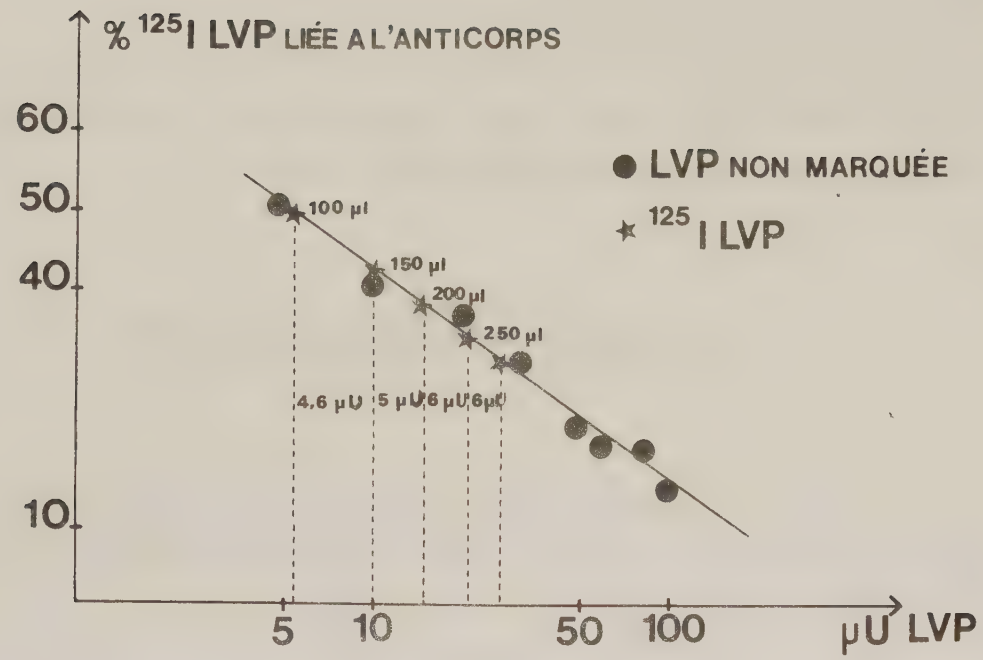
La détermination de la radioactivité spécifique de l'hormone antidiurétique nous a conduite à étudier son comportement immunologique et biologique.

a) ACTIVITE IMMUNOLOGIQUE DE LA VASOPRESSINE RADIOIODEE

Les réactions de la vasopressine radioiodée avec les anticorps anti-LVP ont été étudiées à l'aide du dosage radioimmunologique.

Lorsque des quantités croissantes d'hormone marquée, purifiée par filtration sur gel de Sephadex G 15 sont ajoutées au milieu réactif (ne contenant pas d'hormone non marquée), la fraction d'hormone liée diminue, bien que la quantité totale de ^{125}I-LVP augmente. Les points expérimentaux tombent à intervalles réguliers sur la courbe standard établie à l'aide du peptide de synthèse ; ceci indique que les anticorps anti-LVP ne distinguent pas la lysine-vasopressine iodée de la lysine-vasopressine de synthèse. Cette propriété permet alors de déterminer la concentration hormonale de l'échantillon radioactif et ainsi de calculer la radioactivité spécifique du peptide marqué au cours des différentes étapes de la purification.

La figure montre que 50 µl d'une solution diluée de vasopressine marquée purifiée par filtration sur gel de Sephadex G 15 et renfermant 11 000 cpm produisent en moyenne la même diminution du pourcentage d'hormone marquée liée à l'anticorps que celle observée lors de l'addition de 2,4 µU de LVP de synthèse. Dans ces conditions, l'activité spécifique est alors de


% 125 I LVP LIÉE A L'ANTICORPS
60
50
40
10
● LVP NON MARQUÉE
★ 125 I LVP
100 µl
150 µl
200 µl
250 µl
4,6 µU
5 µU
6 µU
6µU
5
10
50
100
µU LVP

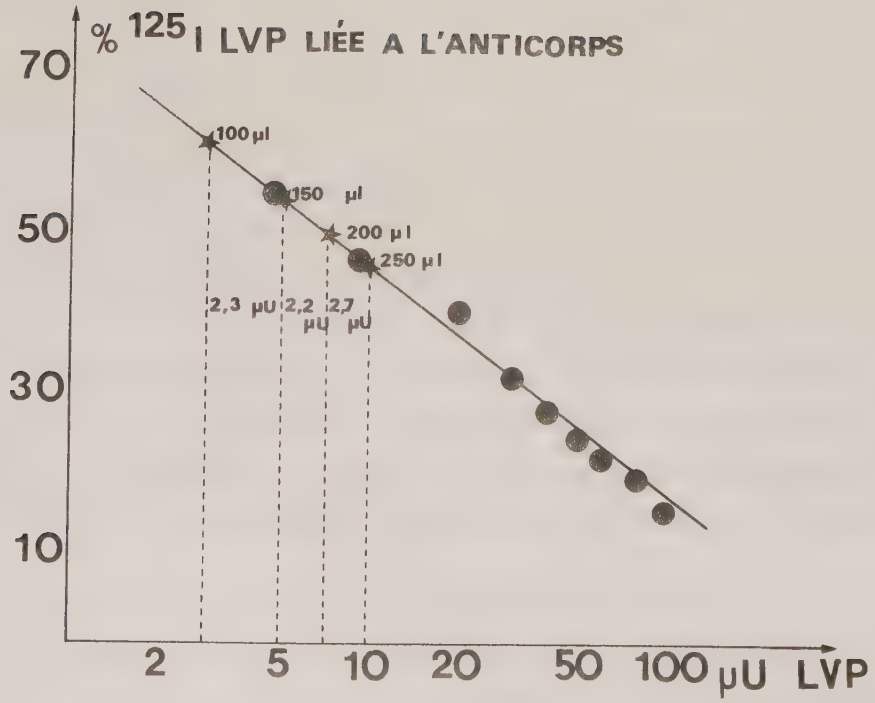

% 125 I LVP LIÉE A L'ANTICORPS
70
50
30
10
100 µl
150 µl
200 µl
250 µl
2,3 µU
2,2 µU
2,7 µU
2
5
10
20
50
100 µU LVP

FIGURE 7 *Dosage de la LVP marquée à l'iode 125*

Chaque incrément de LVP marquée ajouté au mélange réactif produit une diminution du pourcentage d'hormone marquée liée à l'anticorps. Les points expérimentaux se placent à intervalles réguliers sur la courbe standard, impliquant que la LVP iodée et la LVP de synthèse réagissent de manière identique avec l'anticorps.

La figure du haut indique que 50 µl d'une solution de ^{125}I-LVP après chromatographie sur DEAE-cellulose produisent une diminution du rapport B/T équivalente en moyenne à celle que donne l'addition de 5,4 µU de vasopressine de synthèse.

La figure du bas montre que 50 µl d'une solution de ^{125}I-LVP purifiée par filtration sur gel de Séphadex produisent en moyenne une diminution au rapport B/T équivalente à celle observée lors de l'addition de 2,4 µU de LVP de synthèse.

Chaque point a été déterminé par deux mesures expérimentales indépendantes.

1580 µC/nM, ce qui correspond à un degré d'iodation de 0,79 et laisse supposer que l'on a affaire à une hormone marquée monoiodée.

De la même manière, il est possible de calculer la radioactivité spécifique de la solution hormonale avant filtration sur gel de Séphadex G 15, alors qu'une certaine quantité d'hormone non iodée est encore présente. La figure (7) montre que 50 µl d'une telle solution de vasopressine marquée, diluée 800 fois, contenant 7300 cpm, conduit en moyenne à la même baisse du pourcentage d'hormone marquée liée que celle qu'on obtient par addition de 5,45 µU de LVP de synthèse. Dans ce cas, l'activité spécifique de la solution hormonale est seulement de 470 µC/nM, le degré d'iodation est alors de 23 p. cent. La concentration de vasopressine marquée, évaluée dans le pic radioactif est de 92 mU/ml (Tableau II).

b) ACTIVITE BIOLOGIQUE DE LA VASOPRESSINE IODEE

L'activité biologique de la LVP marquée a été aussi suivie au cours des différentes étapes de sa purification.

Le pic radioactif obtenu après chromatographie sur DEAE-cellulose du mélange réactif ayant servi au marquage de l'hormone présente une activité antidiurétique non négligeable : 90 mU/ml, soit 558 mU dans les fractions 5-6-7 rassemblées (Figure 1), ce qui correspond environ à 41 p. cent de la LVP employée pour la réaction d'iodation. La valeur de cette détermination équivaut à celle obtenue précédemment à l'aide la technique radioimmunologique. Le procédé employé pour marquer la vasopressine ne semble donc apparemment pas altérer la structure moléculaire nécessaire à l'activité biologique de l'hormone. Par contre, l'activité antidiurétique mesurée dans les fractions radioactives obtenues après filtration sur gel de Séphadex G 15 et renfermant 80 à 90 p. cent de LVP monoiodée est faible. Elle représente 1 p. cent seulement de l'activité antidiurétique appliquée sur la colonne. Evaluée par méthode radioimmunologique, la quantité de LVP présente dans le pic est de 7 à 12 fois supérieure à celle trouvée en mesurant l'activité biologique (Tableau II).

Ces derniers résultats suggèrent que l'introduction d'un atome

TABLEAU II

Activité biologique, immunologique et radiologique de l'hormone marquée à l'iode 125, au cours des différentes étapes de sa purification

^{125}I-LVP après différents processus de purification	Activité antidiurétique de la LVP	LVP évaluée par méthode radioimmunologique	Radioactivité spécifique	Degré d'iodation
Après DEAE cellulose	90 mU/ml	92 mU/ml	470 µC/nM	0,23
x Après Séphadex G15 (17 ml du pic sont rassemblés)	① 0,93 mU (dans le pic)	7,48 mU (dans le pic)	1580 µC/nM	0,79
	② 1,12 mU (dans le pic)	7,75 mU (dans le pic)	1660 µC/nM	0,83
x Après Séphadex G15 (13 ml du pic sont rassemblés)	③ 0,73 mU (dans le pic)	5,46 mU (dans le pic)	1800 µC/nM	0,90

Dans chacune des trois expérimentations ① - ② - ③ , 1 ml de ^{125}I-LVP provenant de la colonne de DEAE-cellulose est filtré sur gel de Séphadex G 15.

d'iode dans la molécule fait perdre à la lysine-vasopressine son pouvoir antidiurétique ; la présence dans le pic d'un petit pourcentage de LVP non marquée pourrait être responsable de la faible réponse antidiurétique observée.

La concentration en hormone des fractions radioactives obtenues après chromatographie sur DEAE-cellulose, déterminée par la technique biologique, est comparable à celle évaluée selon le procédé radioimmunologique, alors que l'hormone iodée présente a perdu son activité antidiurétique. Mais, comme nous l'avons remarqué précédemment, à ce stade de purification, le pourcentage de molécules iodées est faible (23 p. cent) : aussi la précision du dosage biologique ne nous permet pas toujours d'apprécier une telle différence.

Une perte ou une diminution de l'activité biologique de certaines hormones peptidiques, due à la présence d'atomes d'iode dans la molécule, ont déjà été signalées à plusieurs reprises :

- La LVP monoiodée obtenue par MENARD et coll. (1973), après purification par chromatographie d'affinité sur la neurophysine de Porc couplée à du Sépharose 4B, possède moins de 1 p. cent de l'activité biologique de l'hormone non marquée, mesurée en évaluant la stimulation de l'adényl-cyclase de la medulla de rein de Porc (1973).

- BOCKAERT (1973, *c*) a montré que l'iodation progressive de l'ocytocine par le monochlorure d'iode diminue graduellement l'activité biologique de l'hormone, activité mesurée en évaluant la chute de la pression sanguine de la Poule provoquée par l'injection du peptide naturel.

- La stimulation, par l'ocytocine, monoiodée, de l'adényl-cyclase d'homogénats obtenus à partir d'épithéliums de vessies de Crapauds est de 10 p. cent à 40 p. cent inférieure à celle produite par l'ocytocine non marquée ; de même la capacité du peptide monoiodé à activer l'oxydation du glucose dans les cellules adipeuses isolées est diminuée de 20 à 25 p. cent (THOMPSON et coll., 1972).

- Les réponses à l'angiotensine de l'utérus ou du colon de Rat et de la pression sanguine du même animal diminuent en fonction du nombre d'atomes d'iode présents dans la molécule : selon la réponse biologique considérée, l'angiotensine monoiodée possède un pouvoir biologique représentant

25 à 80 p. cent de celui de l'hormone native, et l'activité du dérivé diiodé n'est plus que 2 à 4 p. cent de celle du peptide naturel (LIN, 1970).

4 - PROPRIÉTÉS DES ANTICORPS ANTI-LVP

Les immunsérums ne peuvent être utilisés comme réactifs du dosage radioimmunologique que s'ils renferment des anticorps spécifiques à un taux suffisamment élevé. D'autre part, la sensibilité du dosage dépendra aussi de l'affinité de l'anticorps pour l'hormone. Nous avons donc été amenée à rechercher des moyens pour mettre en évidence la présence d'anticorps dans les immunsérums obtenus et à vérifier leur spécificité. Nous avons aussi établi le modèle de l'interaction antigène-anticorps, afin de déterminer leur affinité.

a) EVOLUTION DE LA FORMATION DES ANTICORPS ANTI-LVP - MISE EN EVIDENCE DE LEUR ACTION SUR L'HORMONE ENDOGENE ET EXOGENE

Pour un même protocole d'immunisation, le taux d'anticorps anti-LVP formés ainsi que l'évolution de leur formation au cours du temps varient énormément d'un lapin à l'autre. Dans les meilleurs cas, nous avons constaté qu'ils apparaissaient après six semaines de traitement, augmentaient progressivement pendant plusieur mois (8 à 10 mois), pour diminuer ensuite. Un exemple est donné par le tableau III qui montre l'évolution de la formation d'anticorps anti-LVP en parallèle avec le schéma d'immunisation.

Trois animaux (sur sept immunisés) ont développé un diabète insipide plus ou moins important. Les anticorps anti-lysine-vasopressine sont donc, dans ce cas, capables d'inhiber l'activité biologique de l'arginine-vasopressine endogène. Le sérum de ces animaux montrait un taux d'anticorps relativement élevé, mais il ne nous était pas possible d'établir une corrélation entre le taux élevé d'anticorps et leur affinité pour l'hormone. L'apparition d'un diabète insipide chez des lapins immunisés par de la vasopressine a été aussi remarquée par MILLER et MOSES (1969), par MORTON et WAIGHT

TABLEAU III — *Evolution de la fonction d'anticorps anti-LVP observée chez un des lapins immunisés*

Dates	Quantité de LVP injectée (complexée à la sérum albumine)	Voies d'injection	Dilution finale employée pour le dosage
4/05/72	50 U/0,4 ml	rate	
	25 U/0,2 ml	coussinets plantaires	
	25 U/0,2 ml	ganglions inguinaux	
10/05/72	100 U	intramusculaire intrapéritonéale coussinets plantaires	
17/05/72	100 U	"	
1/06/72	100 U	"	
8/06/72		Prélévement sanguin	d = 10
10/06/72	100 U	intramusculaire intrapéritonéale coussinets plantaires	
19/06/72	100 U	"	
28/06/72	100 U	"	
21/07/72	100 U	"	
11/08/72	100 U	"	
22/08/72		Prélévement sanguin	d = 1000
5/09/72	100 U	intramusculaire intrapéritonéale coussinets plantaires	
19/09/72		Prélévement sanguin	d = 3000
28/09/72	100 U	intramusculaire intrapéritonéale coussinets plantaires	
9/10/72		Prélévement sanguin	d = 5000
26/10/72	100 U		
30/11/72	150 U		
11/12/72		Prélévement sanguin	d = 10.000
2/01/73	150 U	Intramusculaire intrapéritonéale coussinets plantaires	
8/01/73		Prélévement sanguin	d = 3000

TABLEAU IV — *Inhibition de l'activité biologique de la lysine-vasopressine par des immunsérums anti-LVP*

Injections	50 µU LVP dans 0,1 ml de sérum physiologique	100 µU LVP dans 0,2 ml de sérum physiologique	50 µU LVP dans 0,2 ml de sérum normal	50 µU LVP dans 0,2 ml d'immunsérum anti-LVP (E)	50 µU LVP dans 0,2 ml d'immunsérum anti-LVP (S)	100 µU LVP dans 0,4 ml d'immunsérum anti-LVP (S) dilué 10 fois
Réponse antidiurétique	37 %	49 %	34 %	7 %	0	0

250 µU de LVP sont incubés 1 heures à 37°C en présence de 1 ml de sérum normal, de 1 ml d'immunsérums anti-LVP E et S, et de 1 ml d'immunsérum anti-LVP (S) dilué 10 fois avec du tampon phosphate de Na 0,01 M, pH 7,5 contenant NaCl 0,15 M.

Les réponses antidiurétiques sont obtenues sur des rats en surcharge hydrique anesthésiés à l'alcool.

(1972). Ces derniers auteurs constatent que la polyurie et la polydipsie des animaux traités s'accroissent au cours du temps ; le titre d'anticorps restant constant, l'augmentation de la polyurie est accompagnée d'une augmentation parallèle de la constante d'affinité. Par ailleurs, WU et ROCKEY (1969) remarquent que l'affinité des anticorps ne varie pas (ou peu), au cours de l'immunisation ou entre animaux traités.

Nous avons en outre constaté que les anticorps anti-LVP étaient capables d'inhiber l'activité biologique de l'hormone antidiurétique exogène. Le tableau IV montre que la réponse antidiurétique de 50 µU de LVP est en grande partie ou totalement annulée lorsque l'hormone est au préalable incubée en présence d'immunsérum anti-LVP, alors que l'incubation avec un sérum de lapin normal n'en modifie pas l'activité biologique. Une inhibition totale de l'activité antidiurétique est encore observée lorsque l'antisérum S est dilué 10 fois ; le titre d'anticorps anti-lysine-vasopressine de ce sérum déterminé par méthode radioimmunologique était environ 10 fois supérieur à celui du lapin E.

b) SPECIFICITE DES ANTICORPS ANTI-LVP - DETERMINATION DU SITE ANTIGENIQUE DE L'HORMONE ANTIDIURETIQUE

La spécificité des anticorps obtenus a pu être testée grâce à l'emploi d'anlogues structuraux de la lysine-vasopressine dans lesquels seulement 1 ou 2 acides aminés sont substitués. Pour cela, des quantités croissantes de différents analogues (0 à 1 ng et 0 à 1 µg) sont ajoutées au mélange réactif renfermant la LVP marquée à ^{125}I et l'antisérum.

Le degré d'inhibition de la liaison ^{125}I-LVP-anticorps observé avec les différentes molécules est comparé à celui obtenu avec des quantités semblables de LVP de synthèse.

- Réactivité de quelques analogues structuraux de la lysine-vasopressine vis-à-vis d'anticorps anti-LVP

La figure (8) montre que l'homovaline^{7}/^{8}lysine-vasopressine, et l'Arg^{8}-vasopressine réagissent de la même façon avec les anticorps que la

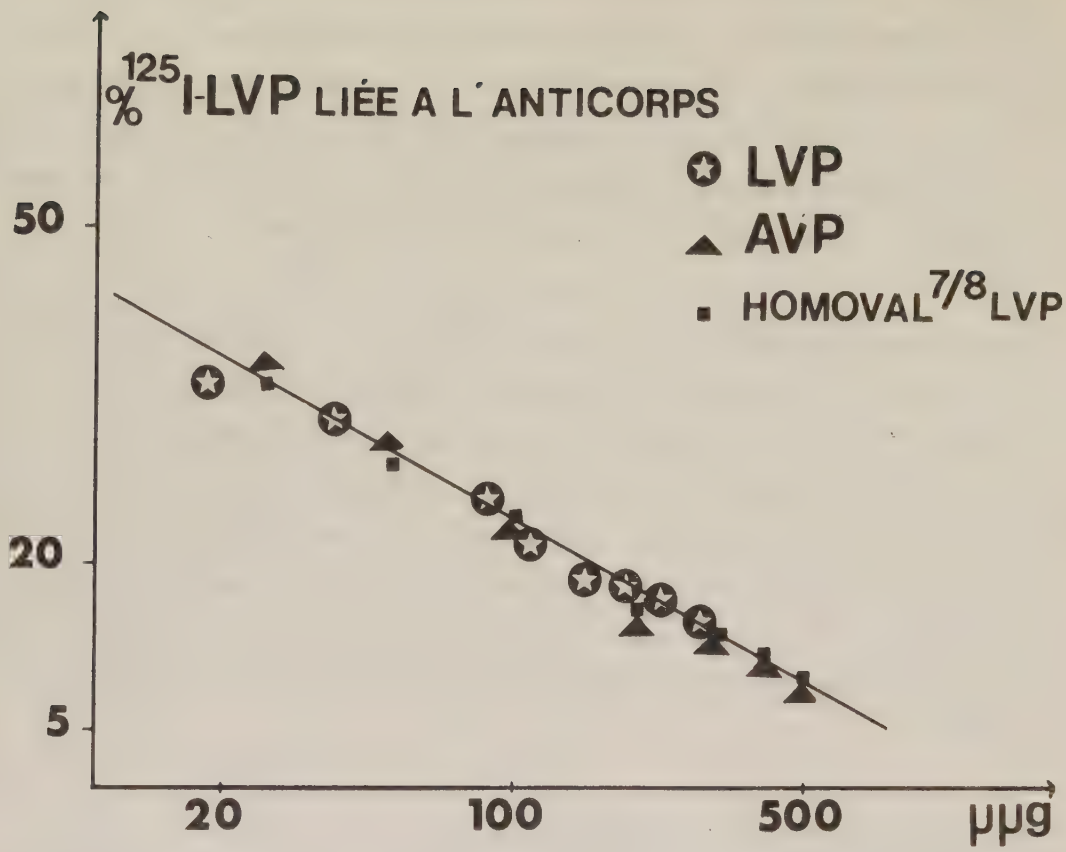


FIGURE 8 — *Réactions croisées de l'Arg^8-vasopressine (O) et de l'homoval$^{7/8}$-lysine-vasopressine avec les anticorps anti-LVP*

Des quantités croissantes de peptides synthétiques sont ajoutées au milieu d'incubation renfermant une quantité constante de ^{125}I-LVP (10 000 cpm) et d'anticorps à une dilution finale de 1/3000.

Chaque mesure est la moyenne de deux déterminations expérimentales indépendantes.

lys^{8}-vasopressine. D'autre part, la Gly^{3}-Lys^{8}-vasopressine et l'Ile^{3}-Lys^{8}-vasopressine, qui ne diffèrent de la LVP que par un seul acide aminé, ne sont pas capables d'inhiber la liaison de ^{125}I-LVP à l'anticorps (Figure 9).

De plus, les anticorps anti-LVP reconnaissent aussi la Phe^{2}-Lys^{8}-vasopressine, mais à un degré moindre ; pour avoir le même pourcentage d'inhibition de la liaison hormone marquée-anticorps, il faut 5 à 7 fois plus de Phe^{2}-Lys^{8}-vasopressine que de LVP.

Des quantités allant de 0 à 1 ng de l'Ile^{3}-Arg^{8}-vasopressine (arginine-vasotocine), de Leu^{3}-Leu^{8}-vasopressine, d'Ile^{3}-Leu^{8}-vasopressine (ocytocine), d'O-methyl thyrosine ocytocine, de Degly^{9}-ocytocine, de Glu (NH_2)^{5}-ocytocine, d'Asp (NH_2)^{4}-ocytocine) sont incapables de déplacer le traceur radioactif de l'anticorps.

Il faut 1000 fois plus d'AVT et 10 000 fois plus d'ocytocine que de LVP pour observer une légère réaction croisée avec les anticorps : 50 ng d'AVT ou 400 ng d'ocytocine sont nécessaires pour obtenir une inhibition comparable à celle observée avec 0,05 ng de LVP (Figure 9).

De ces résultats, on peut tirer les conclusions suivantes :

- La substitution d'un acide aminé aliphatique au noyau phénylalanine en position 3 empêche le peptide d'entrer en compétition avec la ^{125}I-LVP pour se lier à l'anticorps. Ce résidu est donc essentiel à l'activité antigénique de l'hormone.

- Le remplacement de la lysine par l'arginine en 8 et la présence de l'homovaline en $^{7/8}$ n'empêchent pas ces nouveaux peptides de réagir complétement avec l'anticorps. L'utilisation de tels immunsérums dans les dosages radioimmunologiques de l'arginine-vasopressine, hormone naturelle du Rat et de l'Homme, est donc rendu possible par cette constatation.

- L'immunoréactivité de l'arginine-vasotocine et de l'ocytocine aux fortes concentrations laisse supposer que d'autres résidus, autres que le noyau phénylalanine en 3, peuvent intervenir, mais que leur affinité vis-à-vis des sites de l'anticorps est très faible. La différence entre Ile^{3}-Arg^{8}-vasopressine et Ile^{3}-Leu^{8}-vasopressine fait admettre que l'acide aminé en position 8 participerait légèrement à la réaction.

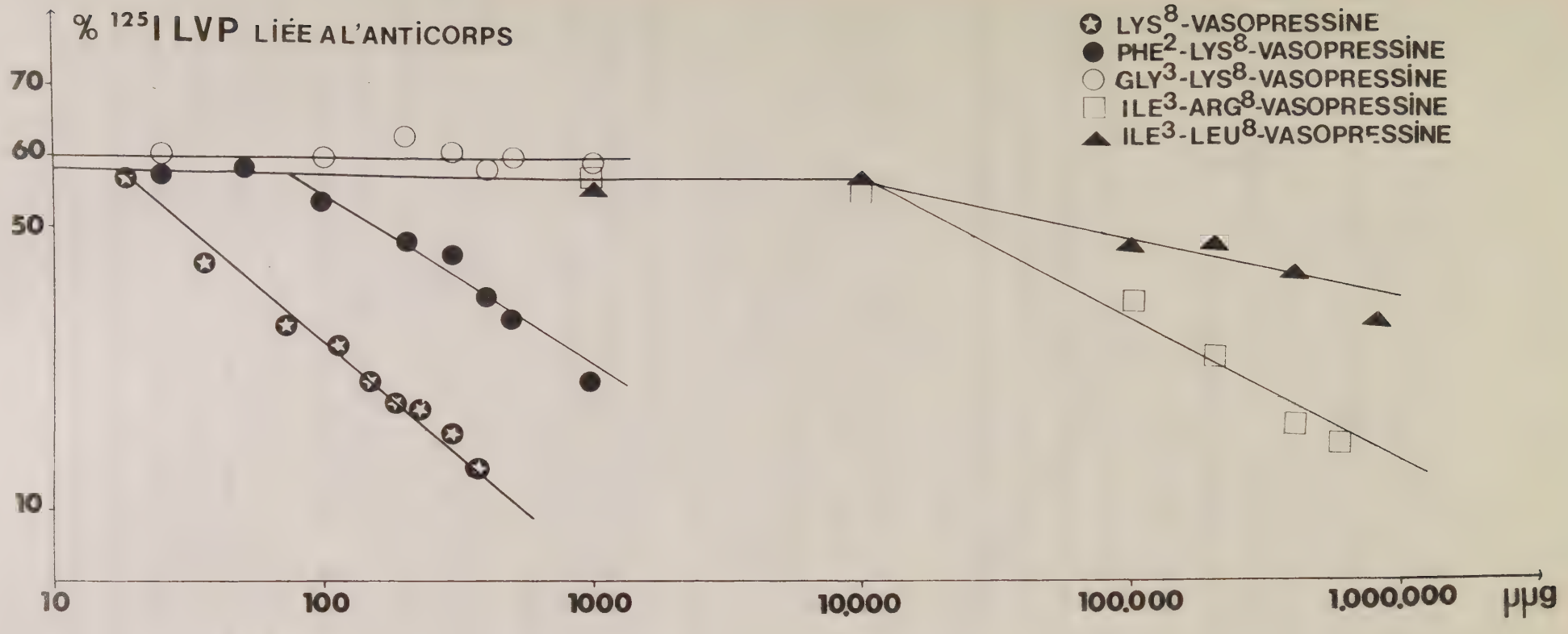


FIGURE 9 — *Réactions croisées de différents analogues de la lysine-vasopressine (LVP) avec un sérum anti-LVP de Lapin (Lapin E)*

Des quantités croissantes de différents peptides sont ajoutées au milieu d'incubation (0,5 ml), contenant une quantité constante d'anticorps (dilution $\frac{1}{3000}$) et de ^{125}I-LVP (8000 à 10 000 cpm).

Chaque point a été déterminé par deux mesures expérimentales indépendantes.

Sur 7 immunsérums anti-LVP testés, cinq présentent les mêmes caractéristiques de spécificité vis-à-vis de l'arginine-vasopressine et de l'ocytocine. Un sérum obtenu avec un lapin de race néozéélandaise (alors que tous les autres sérums proviennet de lapins communs d'élevage) différencie la LVP de l'AVP. Un autre immunsérum montre une légère réaction avec l'ocytocine : dans ce cas, il suffit de 100 fois plus d'ocytocine que de LVP pour observer une inhibition de la liaison ^{125}I-LVP-anticorps, alors qu'avec les six autres immunsérums, des concentrations d'ocytocine 10 000 fois supérieures sont nécessaires.

- Comparaison entre immunoréactivité et activité biologique

Le tableau (V) résume les activités antidiurétiques et immunologiques de quelques analogues structuraux de la lysine-vasopressine et montre que des sites différents de la molécule sont impliqués dans chacun de ces cas. En effet, la présence, dans la molécule, de l'homovaline en $^{7/8}$ ne modifie pas l'immunoréactivité, mais réduit de beaucoup la réponse antidiurétique. D'autre part, l'arginine-vasopressine qui est biologiquement plus active que la LVP est reconnue de la même façon par les anticorps. Il en est de même avec l'arginine-vasotocine. Cette molécule ne réagit avec les anticorps anti-LVP qu'à concentrations très élevées, mais possède un pouvoir antidiurétique comparable à celui de la lysine-vasopressine.

Aucune corrélation n'est donc possible entre activité biologique et immunologique impliquant que ces deux activités nécessitent des structures moléculaires différentes (MARCHETTI, 1973).

- Discussion

Notre étude suggère que le noyau phénylalanine en 3, situé dans la partie cyclique de la molécule, est indispensable à l'activité antigénique de l'hormone. VORHERR et MUNSICK (1970) considèrent aussi que ce résidu est une partie essentielle du site antigénique du peptide neurohypophysaire.

Plus récemment, CZERNICHOW et coll. (1974) ont mis en évidence plusieurs sites antigéniques sur la molécule de vasopressine, en comparant deux immunsérums provenant d'animaux qui avaient subi des traitements immu-

TABLEAU V — *Comparaison des activités immunologiques et biologiques de différents analogues de la lysine-vasopressine*

Analogues	1	2	3	4	5	6	7	8	9		Immunoréactivité (18 µµg à 1000 µµg)	Activité antidiurétiq
Lys^8-vasopressine	Cys	Tyr	Phe	Glu	Asn	Cys	Pro	Lys	$Gly\text{-}NH_2$		100 %	100 % *
Phe^2-Lys^8-vasopressine		Phe									15 % à 20 %	8 % *
Gly^3-Lys^8-vasopressine			Gly								0	∿ 41 %
Ile^3-Lys^8-vasopressine			Ile								0	9,6 % *
$Homoval^7$ ^{8}-Lys-vasopressine							Val	Val	Lys	$Gly\text{-}NH_2$	100 %	∿ 1,5 %
Arg^8-vasopressine								Arg			100 %	167 % *
Ile^3-Arg^8-vasopressine			Ile					Arg			0	100 % *
Ile^3-Leu^8-vasopressine			Ile					Leu			0	1,9 % *
Leu^3-Leu^8-vasopressine			Leu					Leu			0	∿ 0,4 % *

Les activités de la Lys^8-vasopressine sont prises comme références (100 p. cent).

* *Les données concernant l'activité antidiurétique de ces analogues proviennent des données expérimentales de BERDE et BOISSONNAS (1968).*

nitaires différents : un des deux sérums (L 289) issu de lapins immunisés par MENARD selon un processus analogue au nôtre est spécifique de la partie cyclique du peptide, alors que l'autre sérum (547) obtenu en injectant de l'arginine-vasopressine adsorbée sur charbon contient des anticorps dirigés principalement vers les trois acides aminés terminaux de la molécule.

Cependant une telle corrélation entre spécificité immunologique et processus d'immunisation ne peut être maintenue. En effet, la plupart de nos sérums réagissent de la même manière avec l'arginine-vasopressine qu'avec la lysine-vasopressine ; mais, bien que suivant un protocole identique pour immuniser tous nos lapins, nous avons obtenu un sérum capable de différencier la LVP de l'AVP. De la même manière, OYAMA et coll. (1971) observent aussi chez des lapins immunisés avec de la lysine-vasopressine couplée à la sérum-albumine la formation d'anticorps susceptibles de distinguer la LVP de l'AVP.

c) MODELE DE L'INTERACTION VASOPRESSINE-ANTICORPS SPECIFIQUES

- Essai d'une première interprétation

Une description théorique possible du phénomène interaction vasopressine-anticorps spécifique consiste à admettre que l'hormone supposée univalente se fixe de façon réversible sur l'anticorps en venant occuper un seul type de sites récepteurs.

A l'équilibre dynamique de la réaction :

$$(1) \qquad P + Q \rightleftharpoons PQ$$

il est naturel de postuler une relation du type loi d'action de masse entre les différentes concentrations :

$$(2) \qquad \frac{[PQ]}{[P]\,[Q]} = K$$

En outre, on suppose que dans un système contenant à la fois des entigènes marqués P^* et des antigènes froids P, le comportement de chacun

d'entre eux vis-à-vis de l'anticorps Q est absolument identique. Cette hypothèse entraîne une répartition statistique égale de P et de P* entre l'état libre et l'état lié à Q ; mathématiquement :

$$(3) \qquad \frac{\{PQ\}}{\{P\}} = \frac{\{P^*Q\}}{\{P^*\}}$$

Cette interprétation de la réalité n'est bien sûr acceptable que si les résultats expérimentaux sont en accord avec ceux prévus par la théorie. Une telle confrontation s'avère assez commode, lorsqu'il est possible de mettre en évidence deux grandeurs auxquelles les équations du modèle imposent une relation affine. On utilise pour cela une méthode analogue à celle qu'employa SCATCHARD en 1949 lors de l'étude de l'interaction petites molécules-protéines et qu'appliquèrent en 1959 BERSON et YALOW au dosage radioimmunologique de l'insuline.

Le procédé consiste à expliciter la relation analytique qui existe entre :

- d'une part, la concentration totale B d'antigènes liés (marqués froids) :

$$(4) \qquad B = \{PQ\} + \{P^*Q\}$$

- et d'autre part, le rapport B/F de la concentration d'antigènes liés à celui de la concentration d'antigènes libres :

$$(5) \qquad \frac{B}{F} = \frac{\{PQ\} + \{P^*Q\}}{\{P\} + \{P^*\}}$$

(rapport encore égale d'après *(3)* à : $\frac{\{PQ\}}{\{P\}} = \frac{\{P^*Q\}}{\{P^*\}}$)

En désignant par q la concentration totale en anticorps :

$$(6) \qquad q = \{Q\} + \{PQ\} + \{P^*Q\} ,$$

on constate que finalement les relations (2) et (3), imposées par les hypothèses de base du modèle, conduisent à l'équation affine entre B et B/F suivante :

$$(7) \qquad B/F = K (q - B)$$

On réalise la vérification expérimentale de (7) en disposant de n échantillons contenant chacun :

- une même concentration q en anticorps (a priori inconnue)

- une même concentration totale $p^* = \{P^*\} + \{P^*Q\}$ en antigènes marqués,

- et une concentration totale $p = \{P\} + \{PQ\}$ variable et connue en antigènes froids.

Les techniques habituelles de comptage permettent alors l'accès à la valeur du rapport B/T défini par :

$$(8) \qquad \frac{B}{T} = \frac{\{P^*Q\} + \{PQ\}}{\{P^*\} + \{P^*Q\} + \{P\} + \{PQ\}}$$

On passe enfin du rapport B/T au rapport B/F en remarquant l'égalité :

$$(9) \qquad \frac{B}{F} = \frac{\frac{B}{T}}{1 - \frac{B}{T}}$$

et de ce dernier rapport à B, en utilisant la formule :

$$(10) \qquad B = \frac{B}{T} \ (p + p^*)$$

A l'aide des valeurs expérimentales figurant au tableau VI, on représente graphiquement l'allure de la réponse B/F en fonction de B (Figure 10).

On remarque que la dépendance entre ces deux grandeurs n'est manifestement pas linéaire, mais que la courbe tracée représente une fonction décroissante et convexe. La schématisation du phénomène réel s'avère donc trop poussée pour rendre compte de façon correcte des résultats expérimentaux. Il y a alors lieu de modifier les hypothèses de base du modèle précédent. Toutefois, l'égalité (3) ne peut être mise en cause, car nous avons établi expérimentalement que l'hormone marquée se comportait vis-à-vis de l'anticorps de façon identique à l'hormone froide.

- Modèle possible expliquant l'interaction vasopressine-anticorps spécifiques

Une interprétation théorique du phénomène consiste à admettre les hypothèses suivantes :

TABLEAU VI : *Variations de B/F en fonction de B*

N° TUBES	Concentration totale de l'hormone non marquée		$\frac{B}{T}$	$\frac{B}{F}$	$\{P^{*}Q\}$ x 10^{-12} M/l	$\{PQ\}$ x 10^{-12} M/l	$\{B\}$ x 10^{-12} M/l
	µU/0,5 ml	x 10^{-12} M/l					
1 - 1'	0	0	0,66	1,94	10,76	0	10,76
2 - 2'	5	37	0,56	1,27	9,13	20,72	29,85
3 - 3'	10	74	0,49	0,96	7,99	36,26	47,51
4 - 4'	20	148	0,39	0,64	6,36	57,72	64,08
5 - 5'	30	222	0,33	0,49	5,38	73,26	78,64
6 - 6'	40	296	0,29	0,41	4,73	85,84	90,57
7 - 7'	50	370	0,27	0,37	4,40	99,70	104,30
8 - 8'	80	592	0,20	0,25	3,26	118	121,26

Résumé d'une expérience dans laquelle des concentrations croissantes de LVP non marquée sont incubées 20 heures, à 4°C, en présence d'une quantité constante de ^{125}*I-LVP (p = 16,3 x* 10^{-12} *M/ℓ) et d'anticorps à une dilution finale de 1/3000.*

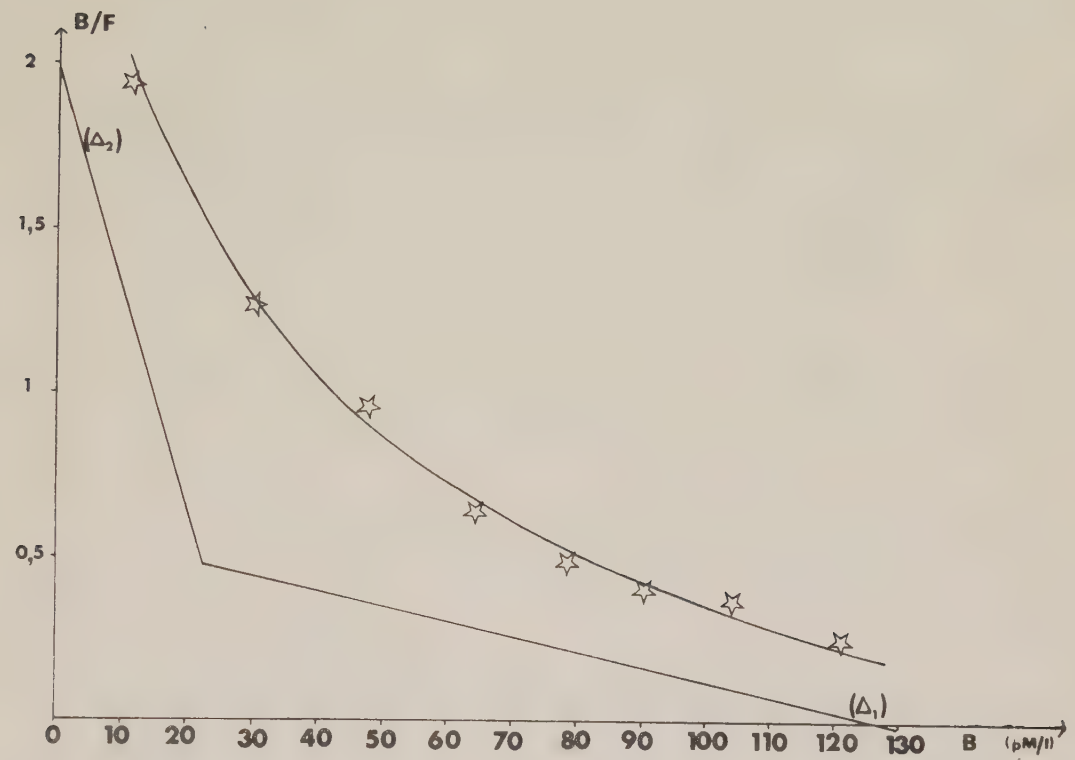


FIGURE 10 : Graphique représentant le rapport B/F : hormone liée/ hormone libre en fonction de la concentration en hormone liée B .

La courbe (☆) a été établie à partir des données présentées dans le tableau 6.

$pM/\ell = 10^{-12}$ moles/litre

α - L'hormone P est univalente

β - L'hormone marquée réagit de la même façon que l'hormone froide

γ - L'anticorps Q présente deux types de sites d'affinité différente, si bien que l'on est en présence des deux équilibres :

(11)
$$P + Q_1 \rightleftharpoons PQ_1$$
$$P + Q_2 \rightleftharpoons PQ_2$$

Les équations régissant les différentes concentrations s'écrivent alors :

(12) $$\frac{\{PQ_1\}}{\{P\}\ \{Q_1\}} = K_1 \qquad \text{(idem pour } P^*\text{)}$$

(13) $$\frac{\{PQ_2\}}{\{P\}\ \{Q_2\}} = K_2 \qquad \text{(idem pour } P^*\text{)}$$

(14) $$\{PQ_1\} + \{P^*Q_1\} + \{Q_1\} = q_1$$

(15) $$\{PQ_2\} + \{P^*Q_2\} + \{Q_2\} = q_2$$

L'expression de la concentration totale en antigène liés

$$xB = \{PQ_1\} + \{PQ_2\} + \{P^*Q_1\} + \{P^*Q_2\}$$

et celle du rapport $y = \frac{B}{F}$

(avec $F = \{P^*\} + \{P\}$) vérifient, comme le montrent les calculs, la relation :

(16) $$\frac{q_1}{x + \frac{y}{K_1}} + \frac{q_2}{x + \frac{y}{K_2}} = 1 = \varphi(x,y)$$

La courbe représentative de l'équation (16) est une hyperbole dépendant de quatre paramètres (K_1 , K_2 , q_1 et q_2), d'asymptotes (Δ_1) et (Δ_2).

(17)
$$(\Delta_1) \quad x + \frac{y}{K_1} = q_1$$
$$(\Delta_2) \quad x + \frac{y}{K_2} = q_2$$

La confrontation de cette dernière théorie avec la réalité expérimentale s'effectue en ajustant les quatre paramètres K_1 , K_2 , q_1 et q_2 de manière à faire passer l'hyperbole d'équation (16) "au plus près des points expérimentaux". Un tel calage nécessite une information équivalente à la donnée de quatre points expérimentaux ; la vérification proprement dite de la loi de variation supposée de B/F en fonction de B ne porte par conséquent sur sur (n - 4) points de n points initiaux.

En utilisant les résultats figurant au tableau (VI) et en donnant aux quatre coefficients les valeurs indiquées ci-dessous :

$$K_1 = 0{,}45 \times 10^{10} \ (M/1)^{-1}$$

$$K_2 = 6{,}9 \times 10^{10} \ (M/1)^{-1}$$

$$q_1 = 130 \times 10^{-12} \ M/1$$

$$q_2 = 30 \times 10^{-12} \ M/1$$

On constate que le phénomène est bien décrit par une équation du type (16).

D'autres manipulations portant sur le même anticorps spécifique, avec la même concentration, conduisent à des fourchettes de variations pour les constantes d'équilibre et les concentrations données par :

$$0{,}15 \times 10^{10} \leq K_1 \leq 0{,}50 \times 10^{10} \ (M/1)^{-1}$$

$$4{,}0 \times 10^{10} \leq K_2 \leq 8 \times 10^{10} \ (M/1)^{-1}$$

$$120 \times 10^{-12} \leq q_1 \leq 140 \times 10^{-12} \ M/1$$

$$30 \times 10^{-12} \leq q_2 \leq 40 \times 10^{-12} \ M/1$$

En définitive, l'introduction d'un modèle théorique supposant l'univalence de l'antigène et l'existence de deux types de sites d'affinité différente conduit à une interprétation satisfaisante des résultats expérimentaux. Cette dernière n'exclut évidemment pas l'hypothèse d'une hormone univalente réagissant avec deux anticorps différents, les équations du modèle étant alors formellement identiques.

Remarquons, en outre, qu'une autre explication, a priori possible

de la réaction suppose que l'antigène "divalent" ou "bi-site" se fixe sur un seul type de site de l'anticorps. Bien que l'allure des courbes expérimentales B/F = f(B) ne rejette pas cette hypothèse, cette possibilité semble moins probable. En effet, la vasopressine est un antigène très petit, et nous avons précédemment montré à l'aide d'analogues structuraux de la vasopressine que dans les conditions expérimentales habituelles, le résidu phénylalanine de la LVP en position 3 est le seul site antigénique intervenant dans la liaison de l'antigène à l'anticorps.

5 - DISCUSSION DU CHOIX DU PROTOCOLE

Une étude statistique préalable nous a conduite à retenir le protocole expérimental suivant :

a) DETERMINATION DE LA COURBE STANDARD

Le modèle précédent (antigène univalent, anticorps à deux types de sites récepteurs) permet d'expliciter une relation analytique entre le rapport

$$\frac{B}{T} = \frac{\{PQ_1\} + \{PQ_2\} + \{P^*Q_1\} + \{P^*Q_2\}}{\{PQ_1\} + \{PQ_2\} + \{P^*Q_1\} + \{P^*Q_2\} + \{P\} + \{P^*\}}$$

d'une part, et la concentration totale en antigène froid : $p = \{P\} + \{PQ_1\} + \{PQ_2\}$

$$\frac{q}{\underbrace{(p + p^*)}_{T} + \frac{1}{K}\,\frac{1}{1 - \frac{B}{T}}} + \frac{q}{\underbrace{(p + p^*)}_{T} + \frac{1}{K}\,\frac{1}{1 - \frac{B}{T}}} = \frac{B}{T} \qquad (18)$$

Connaissant les cinq paramètres (K_1 , K_2 , q_1 , q_2 et p^*) attachés à une solution (P^* , Q) il serait possible de tracer la courbe standard B/T en fonction de $p = \{P\} + \{PQ_1\} + \{PQ_2\}$. Dans la pratique, une telle démarche n'est guère acceptable, parce que la forme implicite de l'équation (18) soulève quelques difficultés de calcul et que surtout les constantes et

les concentrations sont entachées d'incertitude que l'on sait mal évaluer. C'est pourquoi on préfère établir la courbe standard par voie expérimentale. L'emploi des techniques statistiques habituelles a alors l'avantage de conduire à la détermination de l'intervalle de confiance de la réponse à une dose (VALLERON).

- Intervalle de confiance de la réponse à une dose

Pour tracer une courbe standard qui nous permette de doser un échantillon, il nous faut donner pour une série de doses connues un intervalle de confiance de la réponse.

La détermination de l'intervalle de confiance de la réponse à la dose i(i = 1,.....n) nécessite la connaissance :

- d'une estimation r_i de la réponse vraie, mais inconnue μi à la dose i.
- de la variance de cette estimation r_i.

Si y_ij désigne le résultat expérimental de la $j^{ème}$ manipulation pour la dose i, la réponse μi à la dose i sera naturellement estimée par $r_i = \bar{y}_i = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^{m} y_{ij}$.

Quant à la variance V_{r_i} de l'estimation r_i, il n'y a a priori aucune raison pour qu'elle soit la même pour toutes les doses. Aussi celle-ci sera-t-elle estimée pour chaque dose i par :

$$V(r_i) = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^{m} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$$

La demi-longueur de l'intervalle de confiance s'obtient alors en multipliant la racine carrée de cette estimation par t_{m-1}, t_{m-1} désignant le t de Student à m - 1 degrés de liberté correspondant à la sûreté obtenue (95 p. cent en général).

Dans la pratique, où l'on doit souvent se contenter d'un nombre restreint de manipulation par dose, cette méthode n'est plus applicable, car t_{m-1} est élevé et l'intervalle de confiance exagérément grand. On est conduit à formuler l'hypothèse inexacte, mais simplificatrice, selon laquelle la variance est la même, quelle que soit la dose.

D'une manière générale, on effectue deux manipulations pour une dose i donnée. Si on désigne par y_{i_1} et y_{i_2} les valeurs des réponses alors observées et par μi la valeur de la "vraie réponse", on peut écrire :

$$y_{i_1} = \mu i + a_{i_1}$$

$$y_{i_2} = \mu i + a_{i_2}$$

avec $V(a_{i_1}) = V(a_{i_1}) = \sigma_a^2$

Un estimateur sans biais de σ_a^2 est alors fourni par

$$\delta^2 a = \frac{1}{2n} \sum_{i=1}^{n} (y_{i_1} - y_{i_2})^2$$

L'intervalle de confiance de la réponse à la dose i est alors constitué par $\left[\frac{y_{i_1} + y_{i_2}}{2} - t_n \frac{\delta a}{\sqrt{2}}, \frac{y_{i_1} + y_{i_2}}{2} + t_n \frac{\delta a}{\sqrt{2}} \right]$ où t_n représente le "t de Student" à n degrés de liberté correspondant à la sûreté retenue (95 p. cent).

- Choix d'un système de coordonnées

Il est d'usage dans la littérature de tracer les courbes standards après avoir fait un changement de variable sur l'une au moins des grandeurs représentées. On représente le plus souvent la réponse (B/T) en fonction du logarithme de la dose : cette façon de procéder permet en effet de représenter la réponse pour une gamme étendue de valeurs de la dose ; elle présente en outre l'avantage de linéariser une portion importante de la courbe. C'est pour ces raisons que nous avons utilisé ce changement de variable, bien qu'il soit possible d'en retenir d'autres.

Par exemple, la courbe (11) ci-après a été tracée après avoir réalisé deux manipulations pour chacune des neuf valeurs de la dose. La connaissance de la largeur de l'intervalle de confiance a permis de tracer "une bande réponse", zone du graphique dans laquelle est contenue, à 95 p. cent, la vraie courbe réponse. Il a été établi pour chaque dosage que nous avons réalisé des courbes standards analogues.

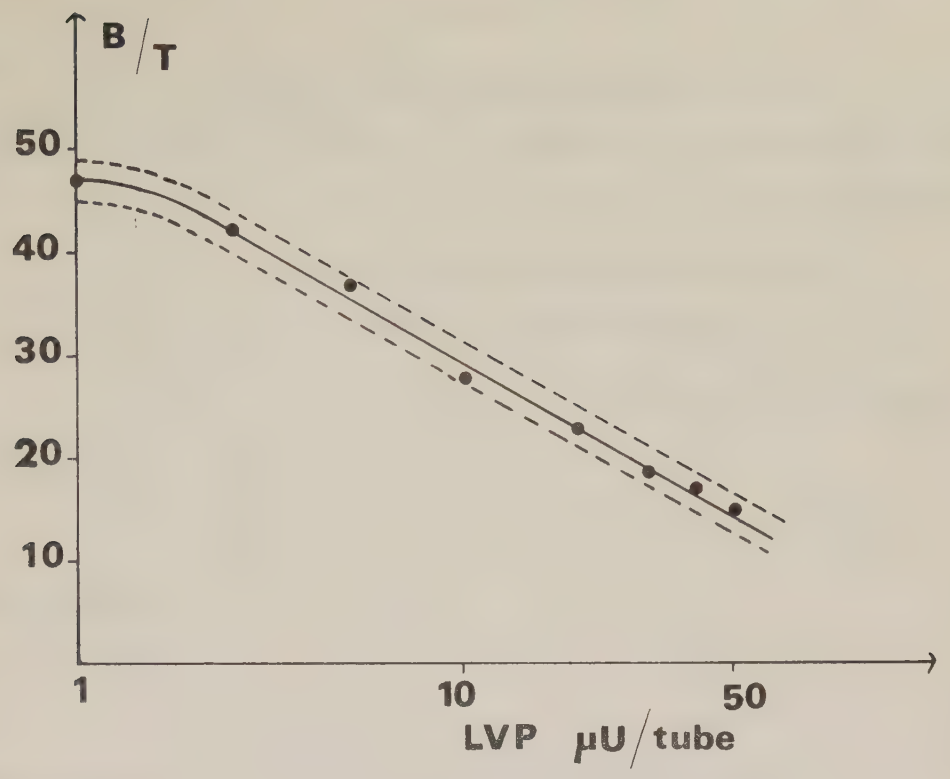


FIGURE 11 Courbe standard moyenne et limite de confiance

Deux manipulations indépendantes sont réalisées pour chacune des valeurs de la dose. L'intervalle de confiance est calculé en négligeant la variation de la variance de la réponse en fonction de la dose.

b) CARACTERISTIQUES DE LA COURBE STANDARD

Les caractéristiques de la courbe standard dans la portion médiane se déduisent des paramètres de la droite d'ajustement des points expérimentaux.

L'équation de cette droite est :

$$y = \bar{y} + \alpha(x - \bar{x})$$

expression dans laquelle

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} y_i \qquad \text{avec} \qquad y_i = \frac{y_{i_1} + y_{i_2}}{2}$$

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{x=1}^{n} \qquad \text{avec} \qquad x_i = \log \rho_i \text{ - (} \rho i \text{ = quantité d'hormone)}$$

$$\alpha = \frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}$$

pente de la droite

- Sensibilité du dosage

La sensibilité du dosage peut s'exprimer par la pente de la courbe standard. Des estimations de cette pente sur une série de dix tracés de courbes (B/T en fonction de log p) conduisent à des valeurs comprises entre - 0,22 et - 0,19.

En d'autres termes, lorsque la concentration de l'hormone froide double, le rapport B/T diminue de 0,0 .

- Différenciation entre deux doses

Deux doses p_1 et p_2 (exemple $p_1 > p_2$) sont dites distinguables si les réponses observées y_1 et y_2 à ces doses vérifient l'inégalité $y_1 < y_2$ 95 fois sur cent.

On retiendra comme réponse observée à une dose la moyenne des résultats du rapport B/T correspondant à cette dose.

Si μ_1 et μ_2 désignent les valeurs "vraies" des réponses aux doses p_1 et p_2, les résultats des manipulations sont des variables aléatoires de moyennes respectives μ_1 et μ_2 et de variance σ_a^2.

Il en résulte que les réponses observées y_1 et y_2 sont des variables aléatoires de moyenne μ_1 et μ_2 et de variance $\frac{\sigma_a^2}{2}$

$y_1 - y_2$ est alors une variable aléatoire de moyenne $\mu_1 - \mu_2$ et de variance σ_a^2

$n \frac{\Delta^2 a}{\sigma_a^2}$ suit par ailleurs un X^2 à n degrés de liberté indépendant des variables y_1 et y_2.

Il en résulte que :

$$\frac{y_2 - y_1 - (\mu_2 - \mu_1)}{\Delta a} = \frac{\frac{y_2 - y_1 - (\mu_2 - \mu_1)}{\sigma_a}}{\frac{\Delta^2 a}{\sigma_a^2}}$$

suit un Student à n degrés de liberté.

Cette variable aléatoire est supérieure à $- t_{90}(n)$ à 95 p. cent.

La relation $y_2 - y_1 > \mu_2 - \mu_1 - \Delta a \, t_{90}(n)$ est donc vérifié à 95 p. cent.

$y_2 - y_1$ est donc positif à 95 p. cent dès que $\mu_2 \quad \mu_1 > \Delta a \, t_{90}(n)$

Compte tenu des relations :

$$\mu_1 = \alpha \log p_1$$

$$\mu_2 = \alpha \log p_2$$

La condition de différenciation s'écrit alors :

$$\log \frac{p_1}{p_2} = - \quad t_{90}(n) \frac{\Delta a}{\alpha}$$

L'expression de cette condition montre que la capacité d'un dosage à distinguer deux doses dépend uniquement du rapport $\Delta a / \alpha$

L'observation d'une série de dix tracés de courbes montre que le rapport varie entre 0,02 et 0,08, ce qui implique des rapports minimaux entre doses à distinguer de 1,07 à 1,40. Ce rapport constitue finalement un indice de sensibilité et par conséquent de qualité du dosage. Si celui-ci venait à être trop grand (> 0,08), on peut soupçonner que l'on se trouve dans un cas suspect et qu'il est préférable de recommencer la manipulation.

- Plus petite dose détectable

Par définition, on appelle "plus petite dose détectable" la plus petite dose qui puisse être distinguée de la dose 0.

Les relations établies précédemment n'étant valables que pour des doses appartenant au domaine linéaire de la courbe ne peuvent manifestement plus être utilisées. La détermination de celle-ci se fera donc graphiquement en prenant la première dose pour laquelle la réponse a un intervalle de confiance disjoint de celui de la réponse à la dose 0.

Cette détermination a été effectuée sur une série de dix tracés de courbes et a conduit à des valeurs comprises entre 2 et 3 µU de lysine-vasopressine pour la plus petite dose détectable.

c) CHOIX DU PLAN EXPERIMENTAL

Pour doser un extrait inconnu, plusieurs méthodes sont a priori possibles. La plus simple, bien entendu, consisterait à reporter sur la courbe standard la réponse B/T observée avec l'extrait. Mais il est préférable pour obtenir des estimations plus précises d'effectuer le dosage sur plusieurs régions de la courbe standard en utilisant la méthode dite "des dosages à plusieurs points". Celle-ci consiste :

- à observer les réponses y_1, y_2, ... y_n (valeurs prises par le rapport B/T) du dosage à des dilutions de facteurs f_1, f_2,..... f_n de la solution à doser,

- à reporter sur le graphique de la courbe standard ces points $M_1(\lambda f_1, y_1)$, $M_2(\lambda f_2, y_2)$..... $M_n(\lambda f_n, y_n)$, λ étant un nombre artitrai-

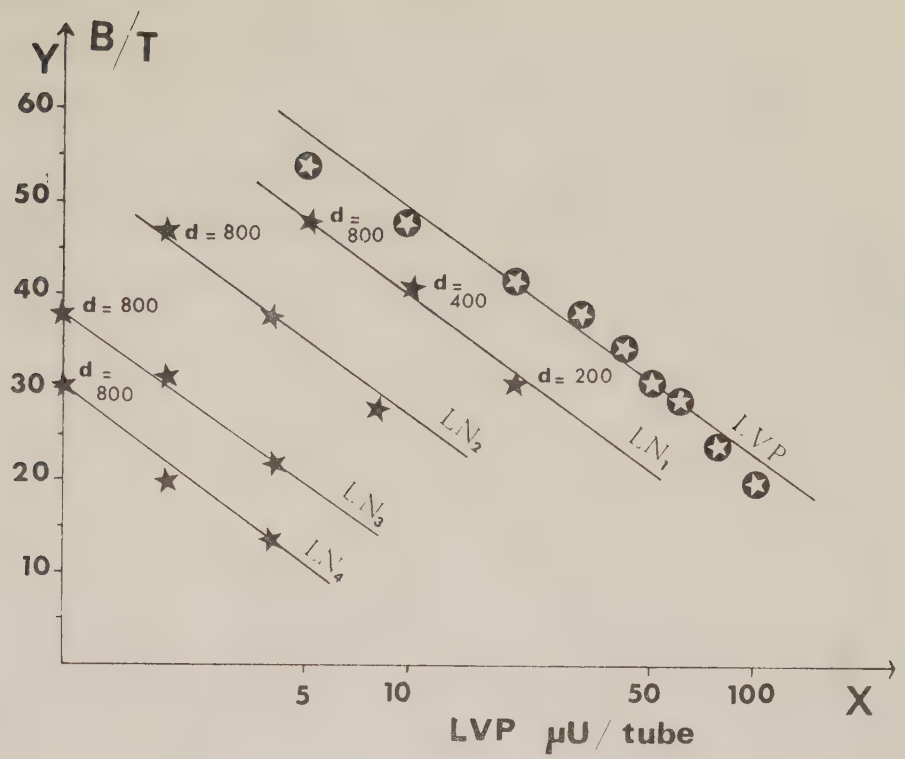


FIGURE 12 : *Dosage de quatre extraits de lobes nerveux LN_1, LN_2, LN_3, LN_4.*

La courbe étalon est construite pour des valeurs allant de 5 µU à 100 µU de lysine-vasopressine de synthèse. Les extraits tissulaires sont dilués 800, 400 et 200 fois. Le point (d = 800) correspondant à une dose Y_1 donnée est choisi à une valeur x arbitraire. Les autres points d = 400, d = 200 correspondant aux effets Y_2 et Y_3 sont construits en tenant compte du facteur de dilution qui est égal à 2.

Chaque point est obtenu à la suite de deux déterminations expérimentales indépendantes.

rement choisi.

- et à tracer la droite d'ajustement de ces points. La quantité de LVP contenue dans une dilution de facteur f est alors déterminée en projetant parallèlement à l'axe des abcisses le point d'abcisse λf de cette droite sur la courbe standard.

La vérification du parallèlisme de la droite M_1M_n et de la courbe standard constitue par ailleurs un test de validité du dosage. Un exemple de dosage de quatre extraits tissulaires (lobes nerveux = LN) est donné par la figure (12).

6 - VALIDITÉ DU DOSAGE

Pour s'assurer de la validité du dosage, nous avons dosé parallèlement par les méthodes radioimmunologique et biologique l'hormone antidiurétique dans un certain nombre d'extraits tissulaires et urinaires, et essayé d'appliquer cette technique à l'évaluation de l'hormone dans les extraits plasmatiques.

a) EVALUATION DE L'HORMONE ANTIDIURETIQUE DANS LES LOBES NERVEUX - COMPARAISON AVEC LE DOSAGE BIOLOGIQUE

Le contenu en vasopressine de lobes nerveux (LN) de rats mâles Wistar, pesant entre 200 et 250 g, est évalué selon les deux méthodes : des valeurs de 429 $\pm$ 30,4 mU/LN (1431 $\pm$ 153 mU/mg de poids sec) et de 642,5 $\pm$ 46,0 mU/LN (2133 mU/mg de poids sec) sont trouvées respectivement avec les techniques radioimmunologique et biologique. La droite de régression linéaire montre une bonne corrélation entre les deux séries de grandeurs ($r = 0,91$). Les valeurs déterminées par l'essai radioimmunologique sont inférieures à celles évaluées par la méthode biologique. Ceci provient du fait que nous dosons de l'arginine-vasopressine en nous référant à une solution standard de lysine-vasopressine. Précédemment, nous avons montré que les anticorps utilisés pour le dosage reconnaissent de la même façon AVP et LVP :

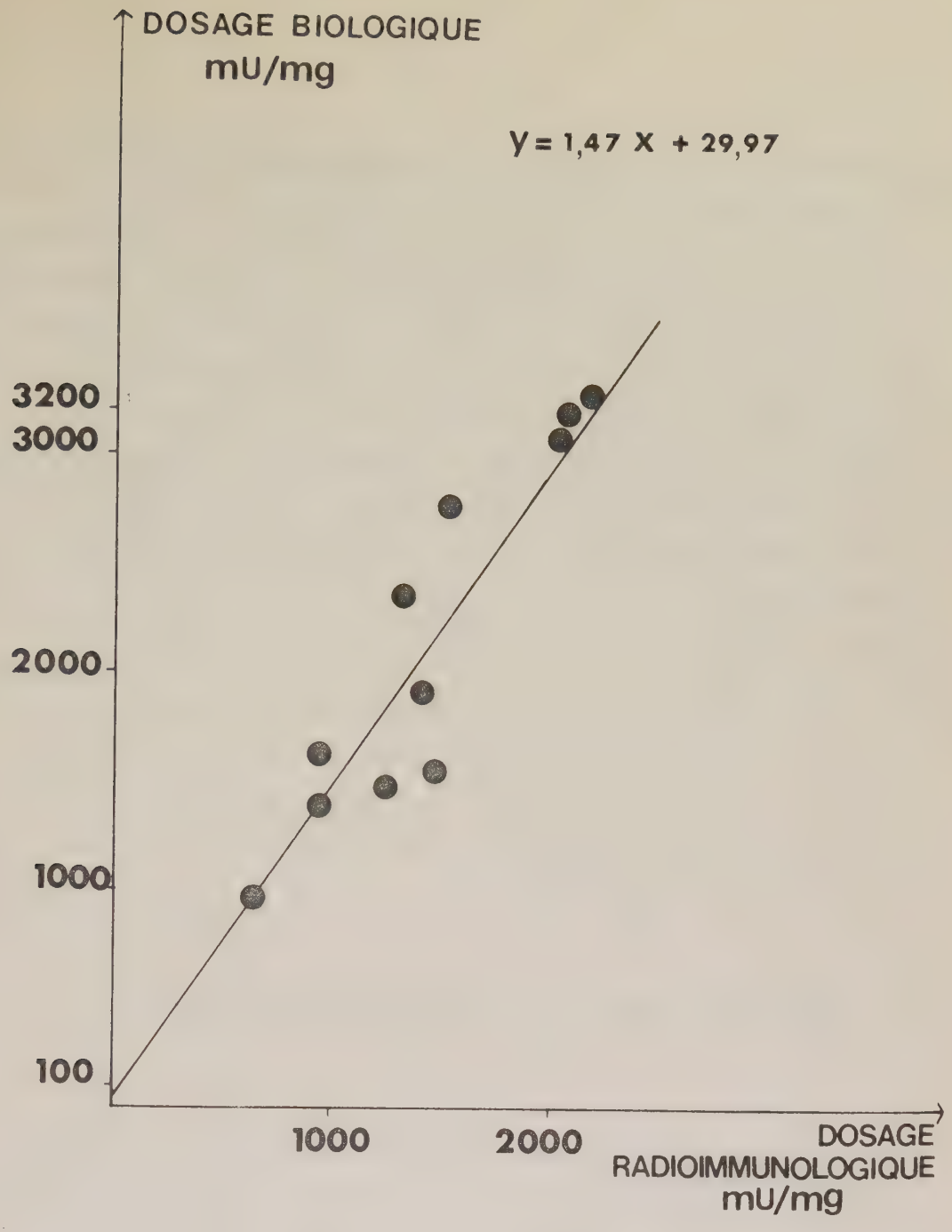


FIGURE 13 : *Evaluation de l'hormone antidiurétique dans des lobes nerveux de Rat. Comparaison entre les méthodes radioimmunologique et biologique.*

Chaque extrait tissulaire renfermant de l'arginine-vasopressine est dosé selon les deux techniques, en employant la lysine-vasopressine de synthèse comme standard. De ce fait, la droite de régression présente une pente différente de 1 (voir texte) : Y = 1,47 x + 29,97. Une bonne corrélation entre les deux séries de mesures est établie : r = 0,91 .

les mêmes quantités (en moles) d'arginine-vasopressine et de lysine-vasopressine produisent une diminution identique du pourcentage de ^{125}I-LVP liée à l'anticorps. De mêmes quantités provoquent par contre des réponses antidiurétiques différentes, l'injection d'AVP produisant une réponse plus importante que celle obtenue avec une quantité analogue de LVP. Plus précisément, une même réponse antidiurétique est obtenue avec une mole d'AVP ou avec 1,67 moles de LVP (BERDE et BOISSONNAS, 1968). Ainsi, l'antidiurèse provoquée par l'injection d'une quantité inconnue d'arginine-vsopressine dans l'extrait à doser (x moles) correspond à celle produite par l'administration de 1,67 x moles de lysine-vasopressine (ou y unités). Les valeurs obtenues par le test biologique doivent donc être 1,67 fois supérieures à celles évaluées par la technique radioimmunologique, la courbe étalon étant établie dans les deux cas avec de la lysine-vasopressine. Lorsque le taux d'hormone antidiurétique mesuré par l'essai biologique est représenté graphiquement en fonction de celui évalué par la technique radioimmunologique, la droite obtenue (droite de régression) présente une pente de 1,47 et non de 1,67. Cette différence de 14 p. cent est probablement liée aux variations multiples qui peuvent exister entre deux tests biologiques.

b) DOSAGE DE L'HORMONE ANTIDIURETIQUE DANS LES URINES

L'excrétion de vasopressine de deux sujets atteints de diabète insipide (DI) d'origine centrale, ainsi que le contenu en hormones de quelques extraits urinaires provenant d'animaux expérimentaux ont été mesurés à la fois par les deux techniques biologiques et immunologiques. Aucune activité biologique et immunologique n'était décelable dans les extraits urinaires des sujets D.I. Une bonne corrélation entre les deux séries de mesures évaluées à partir des urines de rats était obtenue ($r = 0,94$). Comme pour les dosages d'extraits de lobe nerveux, la droite de régression (Figure 14) montre une pente différente de 1 ($y = 1,41\ x + 0,01$).

Déterminée par la technique radioimmunologique, l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique de rats témoins mâles Wistar, privés de nourriture mais ayant accès à l'eau, présente une valeur de $0,245 \pm 0,016$ mU/12 heures/100 g ($n = 30$). Cette valeur est supérieure à

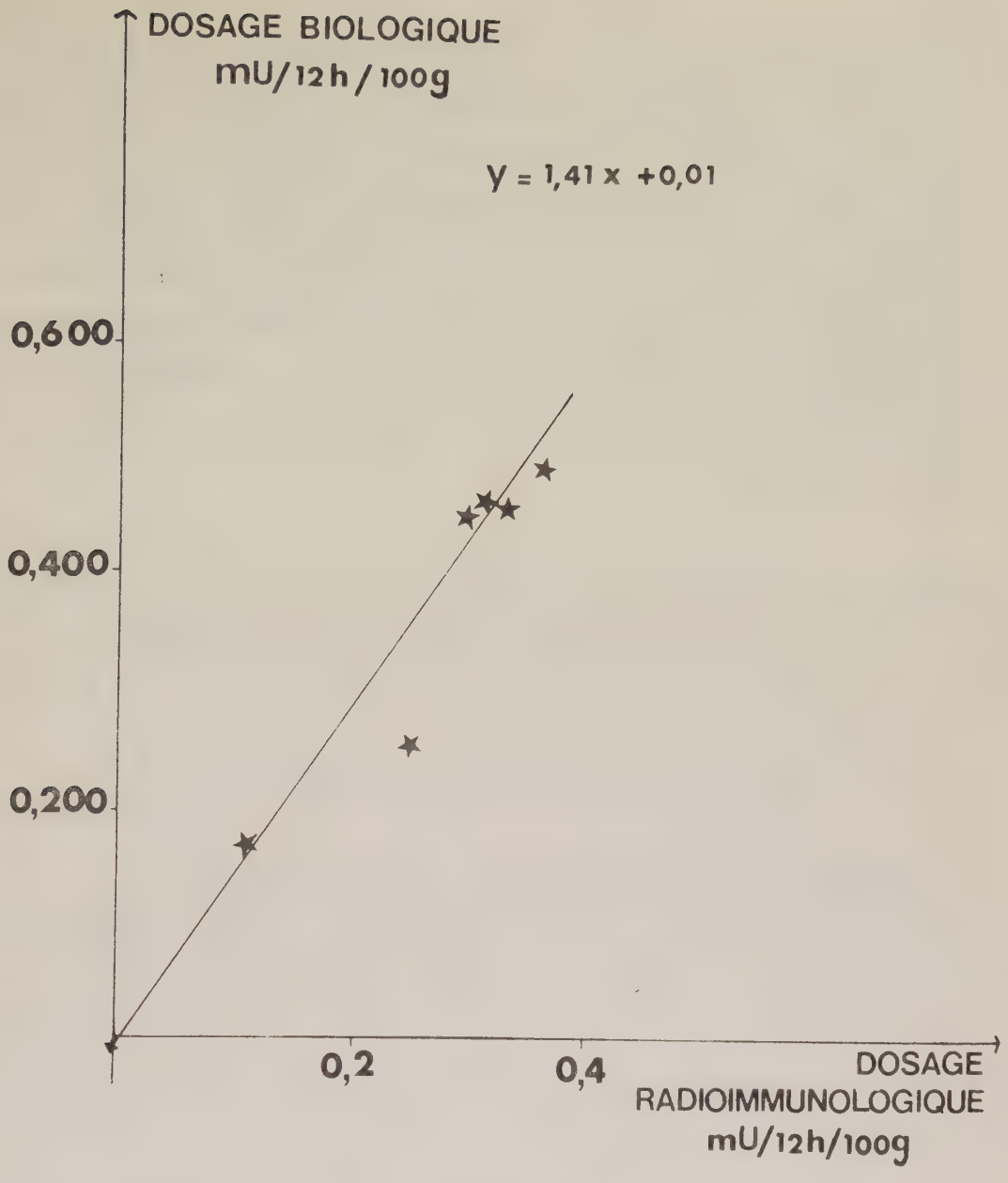


FIGURE 14 : *Détermination de l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique du Rat : comparaison entre les méthodes biologique et radioimmunologique.*

L'hormone est extraite des urines par chromatographie sur Amberlite CG 50 et ensuite dosée selon les deux techniques. L'hormone antidiurétique de référence utilisée est la lysine-vasopressine ; et c'est pour cette raison que la pente de la droite de régression est différente de 1 (voir texte) ; Y = 1,41 x + 0,01. Le coefficient de corrélation est : r = 0,94

celle que nous avons précédemment trouvée, environ 0,100 mU/12 heures/100 g (MARCHETTI et coll., 1972) en dosant l'hormone par la méthode biologique après l'avoir extraite des urines selon la technique de NOBLE et coll.(1939). Cependant, au cours de ces expériences, les prélèvements urinaires s'effectuaient dans des conditions différentes : le nombre d'animaux par cage était plus élevé, et en particulier les cages métaboliques employées différaient par leur forme et leur conception ; ceci peut être à l'origine de pertes plus importantes. En outre, la technique d'extraction employée consistant en une adsorption de l'hormone sur un précipité de ferrocyanure de zinc est grossière, et l'extrait impur peut contenir des substances qui diminuaient la réponse antidiurétique.

En revanche, en employant le même processus d'extraction et la méthode radioimmunologique, MILLER et MOSES (1971) ont déterminé chez des rats normaux Long-Evans, un taux journalier d'ADH excrété de 4,5 $\pm$ 0,6 mU d'AVP/24 heures. Cette estimation est environ trois fois supérieure à la valeur moyenne de l'excrétion hormonale, que nous avons déterminée, exprimée avec les mêmes unités (mU d'AVP/24 heures/Rat) ; -en effet, exprimée en 24 heures et par rat, l'excrétion urinaire de l'ADH que nous avons mesurée est en moyenne égale à 0,980 mU de LVP/24 heures/Rat et équivaut à 1,58 mU d'AVP/24 heures/Rat-. Plusieurs faits peuvent être à l'origine de cette différence : les rats de poids non précisés proviennent d'espèces différentes, les prélèvements urinaires sont effectués sur une période de 24 heures et le rythme nycthéméral de l'hormone est inconnu. En outre, un certain nombre de facteurs difficiles à contrôler interviennent dans la libération de l'hormone antidiurétique (température, bruit, manipulation des animaux, nourriture).

Récemment, FRESSINAUD (communication personnelle) a mesuré à l'aide d'un dosage radioimmunologique sensible et très spécifique l'excrétion urinaire de la vasopressine du Rat placé dans certaines conditions dont on sait qu'elle modifie la secrétion de l'hormone. Lorsque l'animal est soumis à une surcharge en eau correspondant à 5 ml d'eau distillée pour 100 g de poids corporel, l'excrétion urinaire de l'ADH est seulement de 27,2 pg/ 4 heures/100 g. Lorsque l'eau distillée est remplacée par des solutions salines de concentration croissante, l'ADH excrétée augmente et peut atteindre une valeur de 3188 pg/4 heures/100 g, pour une concentration en sels de 3 p. cent. Lorsque la solution de gavage est une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. cent, l'excrétion du peptide neurohypophysaire est

alors égale à 79,7 pg/4 heures/100 g. Si ces dernières mesures apportent une preuve supplémentaire de la validite du dosage radioimmunologique employé par les auteurs, il semble difficile de comparer nos propres résultats obtenus chez l'animal maintenu dans les conditions normales à ces dernières valeurs déterminées chez le Rat soumis à une surcharge. On peut néanmoins constater que, exprimée en pg/4 heures/100 g, l'excrétion urinaire de l'ADH que nous avons déterminée chez les rats témoins est de 302 pg/4 heures/100 g soit 3,8 fois supérieure à celle évaluée chez les rats ayant reçu par voie gastrique 5 ml (pour 100 grammes de poids corporel) d'une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. cent.

c) ESSAI D'APPLICATION DE LA METHODE RADIOIMMUNOLOGIQUE A L'EVALUATION DE L'HORMONE DANS LES EXTRAITS PLASMATIQUES

- Comparaison avec la technique biologique

La présence dans le sang de l'hormone antidiurétique à des taux extrêmement faibles rend son estimation délicate. Aussi avons-nous été incapable d'utiliser la méthode radioimmunologique pour détecter l'hormone antidiurétique circulante chez le Rat normal. En effet, à partir de 0,2 ml d'extrait, volume maximal permettant d'éviter que des substances autres que la vasopressine interfèrent avec le dosage, on peut détecter au maximum 3 µU. Ceci équivaut à une quantité d'hormone de 30 µU pour 2 ml d'extrait (provenant de 5 ml de plasma) ou à une concentration plasmatique de 6 µU/ml en admettant un rendement de 100 p. cent.

Pour être détectable avec un rendement de 65,5 p. cent, le taux d'hormone circulante chez le Rat devrait être supérieure à 9,2 µU/ml. A l'aide de la technique biologique, en injectant à l'animal réactif un volume de 0,6 à 1 ml d'extrait, nous avons trouvé une valeur moyenne de la concentration hormonale égale à 9,97 $\pm$ 1,12 µU/ml. Mais les quantités évaluées par l'essai biologique étant supérieures à celles déterminées par la méthode radioimmunologique (pour les raisons expliquées plus haut), la concentration théorique calculée en corrigeant les valeurs biologiques correspondrait seulement à 6,8 µU/ml, valeur inférieure à la quantité minimale détectable

(9,2 µU/ml) par l'essai radioimmunologique.

La concentration plasmatique en hormone antidiurétique que nous avons évaluée chez le Rat est compatible avec les taux de 3 à 11 µU/ml trouvés d'une part par LITTLE et RADFORD (1964) et d'autre part par FITZ-PATRICK (1969). Mais elle est supérieure à celle déterminée par TATA et GAUER (1966) à l'aide d'un essai biologique sensible (1,5 à 4 µU/ml) et plus récemment par DUNN et coll. (1973) qui emploient un procédé radioimmunologique (2,3 ± 0,9 pg/ml).

Si, au cours des expérimentations qui vont suivre, seule la technique biologique a pu être utilisée pour apprécier la concentration plasmatique de la vasopressine, il nous a cependant été possible d'appliquer la méthode radioimmunologique à l'évaluation de l'ADH circulante chez quelques rats soumis à une anesthésie au chloroforme. Il est connu que ce stress libère des quantités importantes du peptide neurohypophysaire ; aussi, dans ce cas, une concentration élevée de l'ordre de 300 µU/ml est-elle trouvée.

- Discussion

Depuis 1966, plusieurs essais radioimmunologiques de la vasopressine ont été devoloppés grâce à l'obtention d'anticorps anti-vasopressine spécifiques.

Au cours des premiers essais, la sensibilité déjà importante de ces techniques (tableau VII), équivalant à celle que nous avons obtenue, n'était cependant pas suffisante pour évaluer la concentration plasmatique de l'ADH de manière courante et simple. Dans quelques cas, cela s'est avéré possible à la suite d'extractions longues et compliquées, en partant d'un volume important de sang (ROBERTSON et coll., 1970 ; BEARDWELL, 1971 ; JOHNSTON, 1972).

Récemment, ROBERTSON et coll. (1973) et HUSAIN et coll. (1973), employant tous deux le même antisérum (antisérum GLICK) qui contient des anticorps à haute affinité vis-à-vis de l'ADH, ont décrit un dosage radioimmunologique très sensible, capable de détecter 0,01 µU/ml. Cette importante sensibilité leur a permis d'estimer, après un processus d'extraction succint et à partir d'un volume minimal de plasma (1 ml), la concentration

TABLEAU VII

Sensibilité des techniques radioimmunologiques du dosage de l'hormone antidiurétique

Données bibliographiques

Auteurs	Année	sensibilité
PERMUTT	1966	4 µU/tube (LVP
MILLER	1969	25 µU/ml (AVP) 10 µU/tube
EDWARDS	1970	4 pg/tuve (AVP) (1,6 µU/tube)
MENARD	1970	0,75 pg/ml (AVP)
BEARDWELL	1971	10 pg/tuve (AVP) 4 µU/tube
JOHNSTON	1972	2 µU/tube (LVP)
LUTZ	1973	1,35 à 2,70 µU (LVP)
ROBERTSON	1973	0,01 µU/ml (AVP)
HUSAIN	1973	0,1 pg/ml (AVP) 0,4 µU/ml
BURGUBURU	1974	2,5 pg/tube (LVP)
SKOWSKY	1974	0,3 à 0,5 µU/ml (AVP)

plasmatique du peptide neurohypophysaire chez l'homme normalement hydraté. Ces auteurs, auxquels viennent de se joindre tout dernièrement SKOWSKY et coll. (1974), sont les seuls pour le moment à possèder un test suffisamment sensible les autorisant à doser sans difficultés majeures l'hormone antidiurétique dans le sang.

B - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES :

DÉTERMINATION DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES ADÉNYL-CYCLASIQUES RÉNALES ET MESURE DE LA LIAISON DE LA VASOPRESSINE TRITIEE AUX RÉCEPTEURS RÉNAUX

1 - MESURE DE L'ACTIVITÉ DE L'ADÉNYL-CYCLASE SENSIBLE À L'HORMONE ANTIDIURÉTIQUE DANS LES MEMBRANES PLASMIQUES DU REIN DE RAT

a) PREPARATION DES MEMBRANES PLASMIQUES

Après décapitation de l'animal, les reins sont prélevés très rapidement et placés dans une solution isotonique tamponnée froide : Tris-HCl, pH = 7,4 (5 mM), $MgCl_2$ (3 mM), EDTA-Tris (1 mM), sucrose (250 mM). medulla et cortex sont disséqués à froid. Les tissus médullaires ou corticaux provenant de quatre reins sont homogénéisés dans 50 ml de tampon isotonique avec un Potter d'ELVEHJEM. L'homogénat est filtré sur laine de verre. Ajusté à 70 ml, il est centrifugé à 600 g durant 10 minutes à 4°C. Le sur-

TABLEAU VIII : *Liste des produits et des solutions mères utilisés pour la préparation du milieu d'incubation et du réactif d'arrêt.*

MILIEUX	PRODUITS	ORIGINE
Milieu d'incubation	- Tris-HCl 2 M à pH = 7,4	
	- AMP cyclique = AMPc à 10^{-2} M adenosine cyclique monophosphate	Sigma Chemical Company
	- ATP à 10^{-2} M (sel de sodium de l'adenosine triphosphate)	P.L. Biochemical Inc.
	- ATP-{α^{32}} fourni sous forme de sel de sodium et conservé à - 25°C dans une solution d'ethanol à 50 p. cent. radioactivité spécifique = 880 à 1027 mC/mM	Commissariat à l'Energie atomique SACLAY
	- Phosphocréatine	Boehringer
	- Créatine kinase	Boehringer
Milieu d'arrêt	- Tris-HCl M à pH = 7,6	
	- AMP cyclique 10^{-2} M	Sigma Chemical Company
	- ATP 10^{-2} M	P.L. Biochemical Inc.
	- AMP cyclique tritié = AMP-{^{3}H} fourni sous forme de sels d'ammonium radioactivité spécifique = 19 C/mM	Commissariat à l'Energie atomique SACLAY
	- Lysine-vasopressine à 285 IU/mg Des fractions (100 à 300 µl) de solutions à 10^{-3} M sont conservées dans l'azote liquide. Décongelées, ces fractions ne sont plus réutilisables	fournie généreusement par le Docteur GUTTMANN Sandoz
	- Hormone synthétique parathyroïdienne de boeuf (PTH). Son mode de conservation est identique à celui de la vasopressine	Beckmann

nageant est écarté. Le culot mis en suspension dans 70 ml de la solution tampon rendue hypotonique par suppression de sucrose est laissé 10 minutes à température ambiante. Après centrifugation du lysat, le culot est lavé avec 70 ml de la solution hypotonique, puis soumis à deux autres lavages avec 35 ml du même milieu.

b) TECHNIQUE DE LA MESURE ENZYMATIQUE

Le principe de la mesure repose sur l'évaluation de l'AMPcyclique $\{\alpha^{32}P\}$ formé à partir d'ATP-$\{\alpha^{32}P\}$ en présence d'extrait membranaire renfermant l'adényl-cyclase. La technique employée est celle mise au point par BOCKAERT et coll. (1973) pour l'étude des caractéristiques de l'adényl-cyclase de la medulla rénale de Porc.

- Réalisation expérimentale de la réaction enzymatique

La réaction enzymatique est effectuée dans un volume final de 100 µl tamponné avec 100 mM de Tris-HCl pH = 7,4 renfermant 0,25 mM d'ATP, 0,60 µC d'ATP-$\{\alpha^{32}P\}$, 0,75 mM de $MgCl_2$, 20 mM de phosphocreatine, 100 µg de créatine kinase, 1 mM de 3'-5' AMPcyclique.

Ces réactifs communs à tous les tubes expérimentaux forment le "milieu d'incubation" qui est préparé globalement à partir des solutions mères présentées dans le tableau VIII. Il est ensuite distribué dans les différents échantillons réactifs sous un volume de 50 µl.

L'AMPcyclique froid présent en quantité importante dans le milieu d'incubation a pour but d'empêcher la destruction de l'AMPc$\{\alpha^{32}P\}$ par la phosphodiestérase contenue dans les préparation membranaires (HYNIE et SHARP, 1971). D'autre part, le système régénérateur d'ATP constitué par la phosphocréatine et la créatine kinase permet la transformation de l'adénosine diphosphate (ADP) en ATP, maintenant ainsi constante la concentration du substrat au cours de la réaction enzymatique.

Selon les conditions expérimentales, on ajoute au milieu d'incubation 25 µl d'eau ou 25 µl d'une solution aqueuse contenant les hormones

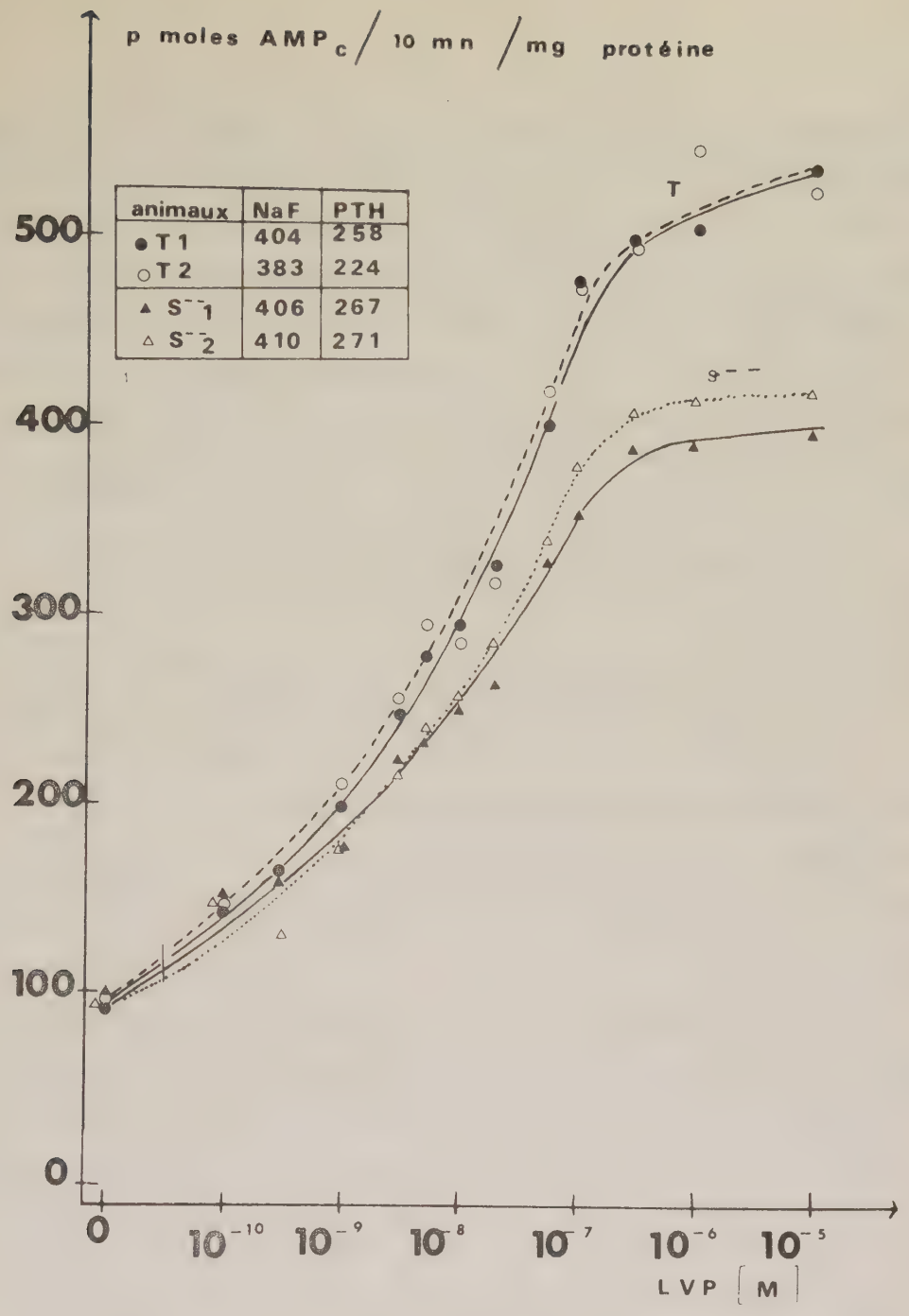


FIGURE 15 : *Courbe dose-réponse de l'adényl-cyclase rénale sensible à l'hormone antidiurétique.*

Les quatres extraits préparés en même temps, dans les mêmes conditions, proviennent de quatre groupes séparés d'animaux : deux groupes formés de rats témoins non surrénalectomisés et deux groupes constitués de rats privés de surrénales depuis 8 jours (chaque groupe comprend deux animaux).
L'activation de l'adényl-cyclase par l'hormone à différentes concentrations est mesurée dans l'ordre suivant : témoins 1 (●), surrénalectomisés $(S^{--})_1$ (▲), témoins 2 (○), surrénalectomisés $(S^{--})_2$ (△).

susceptibles de stimuler l'adényl-cyclase. La réaction, déclenchée par l'addition de 25 µl de l'extrait enzymatique renfermant 90 à 120 µg de protéine, se poursuit pendant 10 minutes à 37°C. Pour l'arrêter, on refroidit brusquement le milieu réactif et on dilue le précurseur radioactif ATP-{α^{32}P} par un excès d'ATP froid. 150 µl d'une solution d'arrêt contenant 50 mM de Tris-HCl à pH = 7,6, 3,3 mM d'ATP, 5 mM d'AMPcyclique et 5.10^{-3} µC d'AMPcyclique tritié sont alors ajoutés à chaque échantillon expérimental. Le milieu d'arrêt est préparé à partir des solutions mères décrites dans le tableau (VIII).

- Séparation de l'AMPcyclique du mélange réactif

Selon la méthode proposée par RAMACHANDRAN et LEE (1970), le nucléotide cyclique est séparé de l'ATP, de l'ADP et de l'AMP non cyclique par chromatographie sur une petite colonne d'oxyde d'alumine sec (hauteur 5 cm, diamètre 0,5 cm) correspondant environ à 1 g d'alumine. L'AMPcyclique est élué par 1,5 ml de Tris-HCl 50 mM, pH = 7,6. La totalité de l'éluat recueillie directement dans une fiole en plastique de comptage correspond à un volume de 1 ml.

L'AMPcyclique tritié ajouté en même temps que le milieu d'arrêt permet de déterminer pour chaque tube d'expérience le rendement du processus de récupération de l'AMPcyclique. Présent en quantité importante, l'AMPcyclique non marqué sert d'entraîneur au cours de la chromatographie sur colonne d'alumine. ATP, ADP et AMP non cyclique restent fixés sur la colonne et il a été possible de montrer que 99,997 p. cent d'ATP sont retenus par l'alumine (BOCKAERT, 1973). Les comptages sont effectués dans le mélange scintillant de BRAY (1960) à l'aide d'un compteur à scintillation liquide réglé de manière à discriminer correctement le tritium du phosphore 32.

c) CONDITIONS EXPERIMENTALES IMPOSEES PAR L'INSTABILITE ET LA VARIABILITE DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES

Les préparations membranaires de reins de Rats maintenues congelées dans l'azote liquide ou au congélateur à - 25°C en présence ou non de dimethyl-sulfoxide (DMSO) perdent une grande partie de leur activité

adényl-cyclasique : l'activité de base de l'enzyme et son activation par la vasopressine diminuent de 60 p. cent ; de plus l'affinité apparente pour l'hormone est réduite.

L'impossibilité de conserver intactes les propriétés de l'adényl-cyclase nous a conduite à effectuer les mesures enymatiques de tels extraits immédiatement après leur préparation.

Dans ces conditions, l'activation de l'adényl-cyclase par la vasopressine présente les caractéristiques suivantes : une stimulation significative de l'enzyme apparaît pour une concentration aussi faible que 10^{-10}M/l d'hormone, et devient maximale avec des concentrations de vasopressine de 5.10^{-7} à 1.10^{-6} M/l. La concentration de vasopressine capable de provoquer une activation correspondant à la moitié de l'activation maximale est d'environ 10^{-8} M/l (cette valeur définit le Km apparent).

Au cours des différents essais, on peut constater que l'activité de base de l'adényl-cyclase et son activation par la vasopressine, la parathormone (PTH) et le fluorure de sodium (Na F) varient d'une série expérimentale à l'autre. L'activité de base peut ainsi varier de 90 à 380 pmoles d'AMPc/10 mn/mg de protéine ; 10^{-5}M de vasopressine peuvent stimuler l'enzyme d'un facteur 5 à 10 et l'affinité apparente peut passer de 1 à 7 10^{-8} M. Cependant, des extraits préparés et testés simultanément, provenant d'animaux différents mais maintenus dans les mêmes conditions, montrent toujours des activités comparables (Figure 15). Au cours des diverses expérimentations, il sera donc indispensable de traiter simultanément les séries témoins et les séries expérimentales. Il en est de même si l'on compare les activités enzymatiques des préparations membranaires de la medulla et du cortex rénal. Mesurées simultanément les activités enzymatiques de base sont comparables dans les préparations médullaires et corticales rénales. En outre, le fluorure de sodium à 10^{-2} M active pareillement l'adényl-cyclase des deux préparations. Cependant, comme l'ont montré CHASE et AURBACH (1968), l'enzyme de la medulla est plus sensible à la vasopressine qu'à la parathormone, alors que cette dernière stimule davantage l'adényl-cyclase du cortex.

2 - MESURE DE LA FIXATION DE LA VASOPRESSINE TRITIÉE AUX MEMBRANES PLASMIQUES RÉNALES DE RAT

a) METHODE UTILISEE POUR L'ETUDE DE LA FIXATION

- Réactifs

Outre les produits déjà cités au paragraphe précédent (1), cette technique nécessite une hormone tritiée pure à haute radioactivité spécifique. La tritiation de la lysine-vasopressine a été effectuée par PRADELLES, J.L. MORGAT et P. FROMAGEOT ; elle a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de neurophysine liée au sépharose de manière covalente par M. CAMIER; D. BONNE et P. COHEN.

Le peptide marqué sur le noyau tyrosine en position 2 possède une activité spécifique de 12 C/mM. Sa pureté radiochimique est vérifiée par chromatographie sur plaque de cellulose. De plus, les tests de la mesure de la pression artérielle du rat et de l'activation de l'adényl-cyclase rénale montrent que l'hormone a conservé toute son activité biologique (BOCKAERT, 1973).

- Protocole

L'extrait membranaire est incubé dans un milieu analogue à celui utilisé pour les mesures de l'activité adényl-cyclasique ; seuls sont omis l'ATP-$\{\alpha^{32}P\}$ et le système régénérateur d'ATP. L'absence de ce dernier ne modifie en rien la liaison de l'hormone tritiée aux fractions membranaires. Après une période d'incubation de 15 minutes à 37°C sont ajoutés 2 ml d'une solution maintenue à 0°C et contenant 100 mM de Tris-HCl, pH = 8, 10 mM de $MgCl_2$, 0,25 mM d'ATP et 1 mM d'AMPcyclique.

L'hormone marquée liée aux membranes est séparée de l'hormone libre par filtration sur filtre Millipore (EAWP 0,45 µ) lavé au préalable

avec 5 ml d'une solution froide contenant 0,1 p. cent de sérum albumine de boeuf, 10 mM de Tris-HCl, pH = 7,8 et 1 mM de $MgCl_2$. Le complexe hormone-récepteur retenu à la surface du filtre est lavé encore 3 fois avec 10 ml de cette même solution. Le temps écoulé entre la fin de l'incubation et la fin du processus de filtration n'excède pas 30 secondes. Les filtres Millipore placés directement dans des fioles de comptage en verre sont séchés sous une lampe chauffante. La radioactivité est comptée dans 8 ml d'un mélange scintillant à base de toluène renfermant 50 mg de 1,4 bis 2(4-methyl-5-phenyl-oxazolyl) -benzène et 4 g de 2,5-diphenyloxazole par litre de toluène.

Des échantillons témoins auxquels on a omis d'ajouter l'extrait membranaire sont traités dans les mêmes conditions. La faible radioactivité détectée dans ces blancs représente une éventuelle fixation du peptide tritié sur les filtres Millipore.

Dans les conditions habituelles, la fixation membranaire de la lysine-vasopressine tritiée est inhibée en présence de LVP non marquée. Cette inhibition peut être importante, mais n'est jamais totale. Une inhibition de 84 p. cent de la liaison de ^{3}H-LVP à une concentration de $2,5 \times 10^{-8}$ M est obtenue en présence de vasopressine à 5×10^{-7} M. Des concentrations plus importantes d'hormone non marquée (supérieures à 10^{-5} M) n'accroissent pas le pourcentage d'inhibition. Cette radioactivité fixée résiduelle représente probablement une adsorption non spécifique de l'hormone marquée sur les membranes.

Par la suite, toute mesure de liaison de la vasopressine tritiée sera accompagnée de l'évaluation de cette fixation non spécifique déterminée en présence de 10^{-5} M de LVP non marquée.

b) CARACTERISTIQUES DE LA LIAISON VASOPRESSINE-RECEPTEURS MEMBRANAIRES

Les expériences ont été effectuées à partir d'extraits provenant de medulla de reins.

On constate que ces préparations membranaires sont capables de lier la lysine-vasopressine et que, pour une concentration donnée du peptide

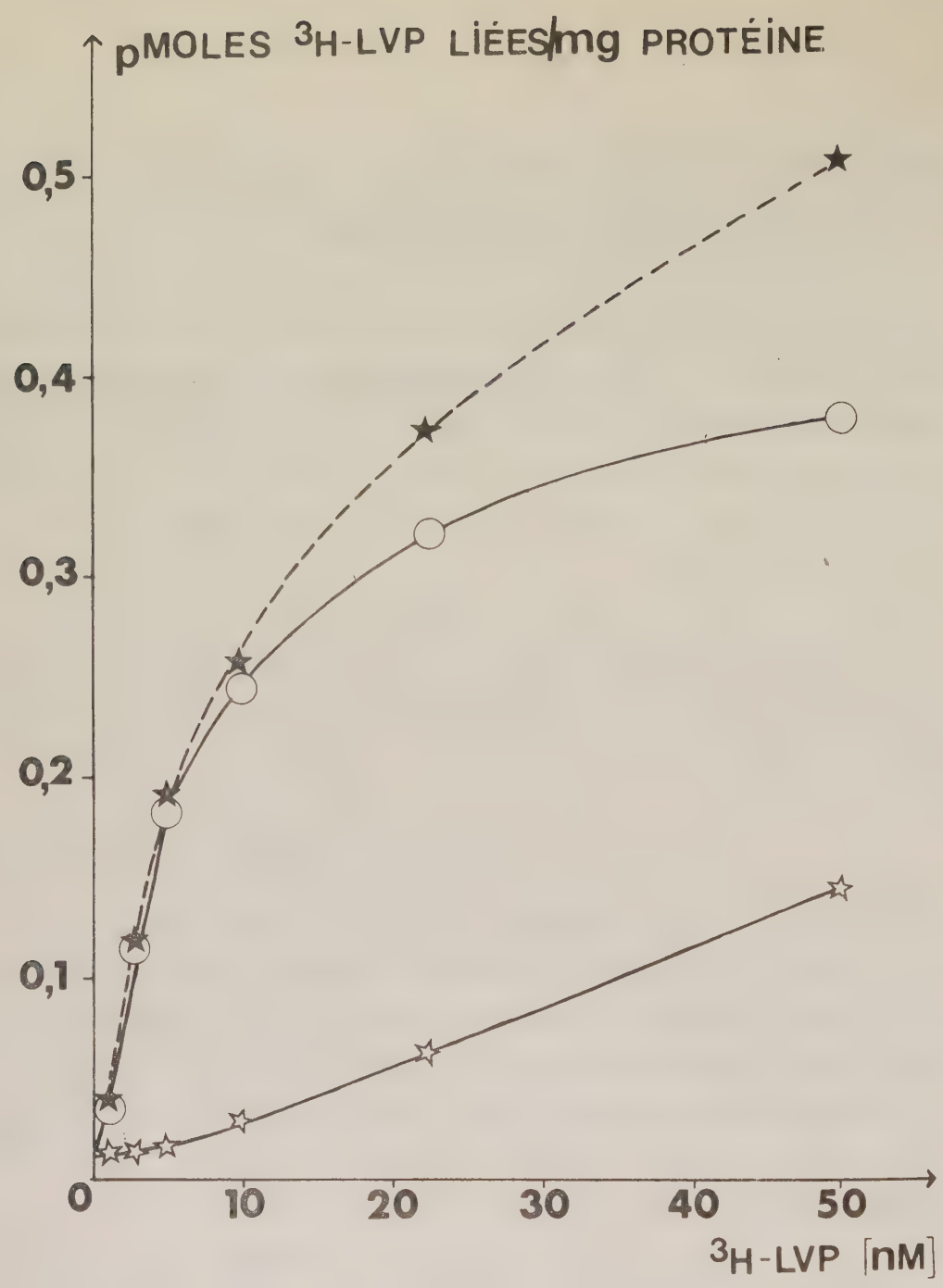


FIGURE 16 : *Fixation de la lysine-vasopressine tritiée aux membranes en fonction de la concentration de ^{3}H-LVP*

L'extrait membranaire renfermant 180 µg de protéine est incubé pendant 15 minutes à 37°C avec des quantités croissantes de ^{3}H-LVP. Pour chaque concentration, la fixation non spécifique (☆) est déterminée en présence de 10^{-5} M de LVP non marquée. A chaque "détermination non spécifique" on soustrait la valeur d'un blanc radioactif (ne renfermant pas de membrane) qui correspond à l'adsorption de ^{3}H-LVP sur le filtre.

La fixation spécifique (O) correspond à la fixation totale (★) diminuée de la fixation non spécifique (☆).

marqué, la quantité de vasopressine tritiée fixée augmente avec le temps d'incubation pour atteindre un équilibre vers la 15ème minute.

- Détermination de la fixation spécifique

La fixation spécifique est déterminée par la fixation totale de laquelle on soustrait la fixation non spécifique. La figure 16 montre que la composante non spécifique, négligeable pour des concentrations inférieures à 10^{-9} M, ne cesse d'augmenter avec les concentrations croissantes de ^{3}H-LVP. Par ailleurs, le tracé de la courbe représentant la fixation spécifique de l'hormone radioactive montre que l'on a affaire à un phénomène saturable, et un maximum semble atteint pour une valeur de 5×10^{-8} M.

Pour des concentrations élevées de ^{3}H-LVP, la capacité maximale de liaison ne peut être déterminée avec précision ; en effet, la radioactivité liée non spécifiquement aux membranes représente alors une fraction importante de la fixation totale.

- Corrélation entre la fixation de lysine-vasopressine tritiée sur les membranes plasmiques et l'activation de l'adényl-cyclase

Plusieurs observations suggèrent fortement que les sites retenant spécifiquement la lysine-vasopressine tritiée sont impliqués dans l'activation de l'adényl-cyclase par l'hormone :

- les courbes dose-réponse représentant d'une part l'occupation progressive des sites récepteurs par la vasopressine tritiée et d'autre part la stimulation de l'adényl-cyclase par des quantités croissantes de vasopressine évolue dans les mêmes gammes de concentrations hormonales.
- après conservation de l'extrait membranaire dans l'azote liquide, la capacité de fixation de ^{3}H-LVP et la stimulation de l'adényl-cyclase à une concentration d'hormone donnée diminue d'un même facteur.
- de plus, on observe un certain parallèlisme dans le comportement des analogues structuraux de la lysine-vasopressine entre leur capacité respective à interagir avec les sites de fixation de la lysine-vasopressine d'une part et leur efficacité à activer l'adényl-cyclase d'autre part.

En effet, l'arginine-vasopressine inhibe davantage la fixation de ^{3}H-LVP sur la préparation membranaire que la lysine-vasopressine ; par contre, l'ocytocine est peu active et n'agit qu'à des concentrations élevées. De la même façon, l'adényl-cyclase est stimulée plus efficacement par l'AVP que par la LVP. Employée aux mêmes concentrations que la lysine-vasopressine, l'ocytocine n'est pas capable d'activer l'enzyme ; des taux plus importants d'hormone sont nécessaires (RAJERISON et coll., 1974).

C - AUTRES MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - ANIMAUX

Les rats mâles Wistar, pesant entre 180 et 230 g, provenaient soit du Centre d'Elevage du CNRS d'Orléans, soit des Etablissements KEMPF de Thiaucourt (54470).

L'ablation chirurgicale des surrénales a été réalisée par incision dorsale après anesthésie au pentobarbital à 5 p. cent (0,1 ml/100 g de poids corporel). Les animaux ont reçu par la suite comme boisson une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. cent.

Les prélèvements urinaires ont été effectués à l'aide de cage à métabolisme STIGMA (Type MS inox : larg. 16 cm, prof. 22 cm, haut. 16 cm). Les rats, privés de nourriture, mais ayant accès à l'eau, ont été placés par deux dans ces cages. Les urines du jour ont été recueillies durant une période de 10 à 12 heures dans des tubes gradués coniques, maintenus au froid dans la glace. Le temps écoulé entre la fin du prélèvement et l'extraction n'a jamais dépassé une durée de 16 heures.

Pour éliminer les variations dues au rythme nycthéméral de la secrétion d'ADH, les rats ont toujours été sacrifiés par décapitation au cours de la matinée. Le sang a été recueilli sur héparine à une concentration finale de 0,2 mg/ml de sang. Après centrifugation à 4°C, les prélèvements plasmatiques ont été conservés congelés à - 30°C jusqu'à l'extraction. Les

différents tissus ayant servi aux expérimentations ont toujours été prélevés immédiatement après le sacrifice.

Neurohypophyses, noyaux supra-optiques, éminences médianes ont été disséqués par les soins de A. BURLET, attachée de recherche au Laboratoire d'Histologie, selon le schéma déjà présenté (1974).

Lorsque les animaux étaient traités aux corticoïdes, ils recevaient matin et soir des injections intramusculaires de dexaméthasone (100 µg/100 g de poids corporel) ou d'aldostérone (12,5 µg/100 g de poids corporel). Les corticoïdes étaient auparavant dissous dans de l'éthanol absolu à une concentration de 10 mg/ml. Juste avant l'injection, la dexaméthasone est diluée dix fois dans du sérum physiologique ; dans le cas de l'aldostérone, une dilution de 100 est effectuée. Des volumes de 0,10 ml/100 g et de 0,12 ml/100 g sont alors administrés respectivement pour la dexaméthasone et pour l'aldostérone.

2 - MESURE DE LA CRÉATININE, DES ÉLECTROLYTES ET DE L'OSMOLALITÉ URINAIRES ET PLASMATIQUES

La créatinine a été dosée selon la technique de JAFFE à l'aide d'un auto-analyseur Technicon. Le sodium et le potassium ont été mesurés en utilisant un photomètre à flamme ZEISS-P.S.F. Pour la détermination de l'osmolalité des liquides biologiques, nous avons employé l'osmomètre FISKE 330 D, qui permet de mesurer des échantillons de 0,2 ml.

CHAPITRE DEUXIEME

ROLE DES GLUCOCORTICOIDES DANS LA SECRETION DE L'HORMONE ANTIDIURETIQUE

RÔLE DES GLUCOCORTICOÏDES DANS LA SECRÉTION DE L'HORMONE ANTIDIURÉTIQUE

A - INTRODUCTION

La fabrication par les noyaux hypothalamiques et la libération par la neurohypophyse de l'hormone antidiurétique se trouvent influencées par un certain nombre de facteurs dont les principaux sont d'ordres osmotique et volémique. Les premiers sont bien connus depuis les travaux de VERNEY (1947) : l'injection de substances hypertoniques dans la circulation carotidienne accroît la secrétion de l'hormone antidiurétique en stimulant les osmorécepteurs hypothalamiques. Ces détecteurs sont d'une extrême sensibilité et des modifications de l'osmolalité plasmatique de 1 à 2 p. cent sont susceptibles d'avoir des effets sur la diurèse. Si à cette époque, seules les modifications de la diurèse ont servi à l'établissement de ces données, une étude récente (FRESSINAUD et coll., 1974) dans laquelle l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique est dosée par une technique radioimmunologique confirme ces observations.

Les seconds facteurs de régulation volémique ont été découverts quelque peu fortuitement par GAUER et coll. (1954) au cours de recherche sur la respiration en pression négative. L'effet diurétique observé au cours d'une dépression intrathoracique est dû en fait à la dilatation des cavités cardiaques notamment de l'oreillette gauche, laquelle possède des récepteurs de distension (PAINTAL, 1953) dont l'excitation inhibe la secrétion de l'hormone antidiurétique, l'information cheminant en direction des centres par les fibres vagales. Par ailleurs, WEINSTEIN et coll. (1960) ont mis en évidence un taux plasmatique accru d'ADH circulante après hémorragie. Ces données ont été confirmées plus tard par HENRY et coll. (1968) puis par JOHNSON et coll. (1970). Selon DUNN et coll. (1973), l'augmentation de la secrétion du peptide neurohypophysaire n'est dans ces conditions vraiment significative que lorsque la volémie diminue d'au moins 8 p. cent ; ces auteurs montrent en outre que

dans les conditions d'hypovolémie, la réponse aux stimuli osmotiques est intensifiée. Cette dernière observation est en accord aux constatations plus anciennes de MOSES et MILLER (1971, b) qui ont remarqué que, chez l'homme, le seuil osmotique auquel l'ADH était relâché, était influencé par des variations du volume plasmatique : une diminution de la volémie diminuait le seuil osmotique alors que ce seuil augmentait après expansion du volume sanguin.

Les modifications de la secrétion de l'hormone antidiurétique par les stimuli volémiques dépendent non seulement des variations de l'activation des volorécepteurs de l'oreillette gauche, mais aussi des barorécepteurs du sinus carotidien (SHARE, 1966, a) et de la crosse aortique ROCHA E SILVA et ROSENBER (1969), ainsi que des chémorécepteurs du sinus carotidien (SHARE, 1966, b). Lorsque ces changements sont modérés, les barorécepteurs du sinus carotidien ne semblent pas être mis en cause (SZCZEPANSKA - SADOWSKA, 1972) et selon ce même auteur le tronc vago-sympathique gauche contiendrait les récepteurs les plus sensibles aux modifications de la volémie.

A côté de ces principaux facteurs susceptibles de solliciter ou de moduler la secrétion d'ADH, il existe un autre groupe important de stimuli neurogéniques qui déclenchent la libération de l'hormone ; traumatisme, douleur (MORAN et coll., 1964), stress émotionnels (MIRSKY et coll., 1954). Probablement des influx nerveux prenant naissance soit dans la périphérie (douleur) soit par l'intermédiaire d'organes spéciaux des sens (vue ou sons effrayants) sont à l'origine de cette libération.

Beaucoup de substances sont aussi susceptibles de provoquer la libération de vasopressine : parmi celles-ci la morphine, la nicotine, l'acétylcholine, certains tranquilisants et certains anesthésiques généraux. Des données plus précises (LUTZ et coll., 1969) montrent que l'anesthésie à l'éther provoque, deux minutes après l'agression, une décharge brutale d'ADH (312 ± 73 µU/ml) avec retour au niveau de base dès la 4ème minute. Ces mêmes auteurs mettent aussi en évidence une libération importante de vasopressine à la suite d'administration d'histamine, mais dans ce cas le retour à la normale n'a lieu qu'au bout d'une heure. Toutes les substances n'agissent vraisemblablement pas de la même façon ; elles peuvent exciter ou libérer certaines cellules supra-hypothalamiques d'un état d'inhibition, mais la voie finale commune, c'est-à-dire le système supra-optico-hypophysaire est excité et une libération d'hormone se produit à partir du lobe postérieur. Par

ailleurs, l'angiotensine administrée par voie intraveineuse (BONJOUR et MALVIN, 1970) ou par voie intracérébrale (MOUW et coll., 1971) provoque aussi un accroissement de la concentration plasmatique du peptide neurohypophysaire, laissant supposer un rôle de l'angiotensine dans la régulation de la secrétion d'ADH. Plus récemment, KEIL et coll. (1975) confirment ces observations et apportent de nouveaux arguments en faveur de l'intervention de l'angiotensine II dans la libération d'ADH.

Parmi les facteurs qui contrôlent la secrétion de l'hormone antidiurétique, les glucocorticoïdes ont souvent été l'objet de controverses. Cependant, un certain nombre d'expériences montrent que la secrétion d'ADH peut être inhibée par des injections de glucocorticoïdes (GAUNT et coll., 1957 ; Mc CANN et coll., 1958 ; de WIED et coll., 1959 ; DINGMAN et DESPOINTES, 1960 ; MIAHLE-VOLOSS et coll., 1967). Bien que ces expérimentations soient réalisées dans des conditions différant notamment des conditions physiologiques normales, elles laissent supposer un effet rétroactif des glucocorticoïdes sur la secrétion physiologique de l'hormone antidiurétique ; et c'est à ce rôle régulateur des glucocorticoïdes que nous nous intéressons particulièrement. Ces stéroïdes pourraient en effet agir soit sur la synthèse de l'hormone, soit sur sa libération, et leur absence serait susceptible d'induire non seulement un hypervasopressinisme mais encore des modifications des structures nerveuses impliquées dans la synthèse de la vasopressine et dans son stockage. Si, en effet, dans les glandes productrices d'hormones stéroïdiennes, les quantités d'hormone libérées dans le sang dépendent directement du taux de biosynthèse hormonale, il n'en est pas de même pour les cellules neurosecrétrices qui ont la possibilité de stocker les produits de secrétion.

Ainsi, certains stimuli entraînent une libération accrue d'hormone antidiurétique qui peut être accompagnée ou non d'une diminution du contenu hormonal neurohypophysaire : en effet, le contenu en ADH du lobe nerveux des rats deshydratés est nettement inférieur à celui des rats normaux (DIAMOND, 1956 ; MOSES, 1963, a ; JONES et PICKERING, 1969 ; BURLET et coll., 1973). Par ailleurs, VILHARDT (1970) met en évidence non seulement une baisse de la teneur en ADH de la neurohypophyse au cours d'une déshydratation, mais aussi une quantité accrue de vasopressine dans la glande au cours d'une surcharge en eau. Cependant, aucune modification du contenu neurohypophysaire en ADH n'apparaît lorsque les animaux sont soumis soit à un stress douloureux,

soit à une anesthésie ou même à une hémorragie (MOSES et coll., 1963, b ; DANIEL et LEDERIS, 1966).

D'autre part, au cours de stimuli prolongés (privation d'eau, perfusion de solutions salines hypertoniques), une activité synthétique importante de la cellule neurosecrétrice est suggérée par de nombreuses données histoenzymologiques et biochimiques : augmentation de l'activité de la thiamine-phosphate-phosphohydrolase hypothalamique (BURLET, 1971), augmentation du taux d'acide ribonucléique au niveau des noyaux supra-optiques (EDSTROM et coll., 1961). De plus, l'hypothalamus de rats deshydratés durant quatre jours, incubé "in vitro" en présence de cystéine ^{35}S ou de thyrosine ^{3}H, synthétise en 4 ou 6 heures trois fois plus de vasopressine marquée que l'hypothalamus d'animaux ayant eu libre accès à l'eau de boisson (TAKABATAKE et SACHS, 1964). Ainsi le message nerveux qui permet la libération de vasopressine serait aussi "perçu" par la cellule neurosecrétrice en vue d'une activité synthétique hormonale plus importante.

Une telle activité biosynthétique est difficile à observer lorsqu'on a affaire à un stress aigu. Jusqu'à présent, il n'existe aucune preuve convaincante qu'un stimulus aigu provoquant la secrétion d'ADH conduise à une augmentation immédiate du taux de synthèse hormonale (comme c'est le cas pour les hormones surrénaliennes). Cependant, certaines observations de microscopie optique (ROTHBALLER, 1953) et électronique (ZAMBRANO et DE ROBERTS ; SACHS et coll., 1967) le suggèrent fortement.

On peut donc penser que le dosage d'ADH dans ces tissus nerveux, chez les animaux déficients en glucocorticoïdes permettrait alors de préciser si ce stéroïde intervient au niveau de l'hypothalamus lieu de fabrication de l'hormone ou au niveau de la neurohypophyse, lieu de sa conservation.

Notre étude a porté essentiellement sur des animaux surrénalectomisés. L'ablation totale des surrénales entraîne, en plus des réactions dues au manque de glucocorticoïdes, des perturbations importantes consécutives à l'absence de minéralocorticoïdes : le manque d'aldostérone empêchant l'animal de réabsorber le sodium, celui-ci réagit aux pertes d'eau qui en résultent en secrétant plus d'ADH (SHARE et TRAVIS, 1970). Pour étudier seulement les conséquences de l'absence de glucocorticoïdes, il est nécessaire d'éliminer cette cause d'hypervasopressinisme en fournissant aux animaux surrénalectomisés

un régime sodé compensateur.

Ainsi, après avoir recherché la présence d'un hypervasopressinisme chez les animaux surrénalectomisés recevant un apport en sodium, nous avons étudié, dans ces conditions, les variations du contenu en hormone des noyaux supra-optiques (NSO), des éminences médianes (EM) et des neurohypophyses (LN).

Nous nous aommes aussi demandée si les modifications observées dans le contenu en ADH de ces tissus nerveux étaient semblables lorsque les animaux privés de surrénales ne recevaient pas de sodium et chez lesquels l'hypersecrétion hormonale résultait essentiellement de l'hypovolémie. Ceci nous a conduit à établir le bilan de l'hormone antidiurétique de ces animaux maintenus dans de telles conditions.

Il était ensuite nécessaire de vérifier que les modifications observées chez les animaux surrénalectomisés traités au sodium étaient bien dues à la seule absence de glucocorticoïdes : nous avons alors regardé si un traitement à la dexaméthasone (corticoïde à caractères essentiellement glucocorticoïdes) ramenait à la normale les valeurs en ADH observées. Ces résultats ont été ensuite confrontés à ceux que donnait l'administration d'aldostérone.

B - Bilan de l'hormone antidiurétique chez le Rat après surrénalectomie

1 - chez le Rat surrénalectomisé soumis à un régime sodé

Les animaux privés de surrénales recevaient comme compensation en sels, une solution isotonique de chlorure de sodium en guise de boisson. Soumis à un tel traitement, ces animaux pouvaient être maintenus en vie indéfiniment. Dans l'ensemble des expérimentations, le bilan de l'ADH a été

établi huit jours après la surrénalectomie.

a) DETERMINATION DE LA VASOPRESSINEMIE

L'hormone antidiurétique dosée par la technique biologique est auparavant extraite du plasma par adsorption sur billes de verre (voir méthodologie). Rappelons que les plasmas de deux rats du même groupe expérimental sont rassemblés au début de l'extraction. Le manque de sensibilité des animaux réactifs utilisés pour l'essai biologique ne nous pas toujours permis de mettre en évidence la présence d'ADH dans les extraits.

L'examen des résultats présentés dans le tableau IX montre une dispersion importante des valeurs trouvées pour la vasopressinémie des rats surrénalectomisés et traités au sodium. Quatre extraits sur treize renfermaient peu d'ADH et n'ont pu être évalués à cause du manque de sensibilité du dosage : leur concentration était inférieure à 15,3 µU/ml. Cependant, l'étude statistique réalisée sur les échantillons qui ont pu être déterminées montre que, chez ces rats surrénalectomisés, le taux plasmatique d'ADH circulante est significativement supérieur à celui déterminé chez les rats contrôles. Lorsqu'on effectue les calculs statistiques en donnant aux plasmas qui n'ont pu être dosés une concentration égale à 10 µU/ml, valeur correspondant au taux plasmatique des témoins, la moyenne devient égale à 21,9 $\pm$ 5,2 µU/ml et l'augmentation reste significative pour un seuil de sécurité de 90 p. cent ($p < 0,1$).

Mais quelques remarques s'imposent. Une remarque importante concerne la détermination plasmatique de l'ADH chez les rats témoins qui ont subi, huit jours auparavant, un stress opératoire. En effet, limitée par la sensibilité du dosage, nous avons inclus dans la moyenne seulement les concentrations hormonales d'échantillons qui ont pu être effectivement dosés, c'est-à-dire ceux dont la concentration est la plus élevée. Cette moyenne n'est donc pas un estimateur sans biais de la vasopressinémie de la population des rats témoins, mais constitue un majorant de celle-ci (tableau IX). Cette surestimation (et éventuellement le stress opératoire) peut en partie expliquer la valeur élevée (9,9 $\pm$ 1,1 µU/ml) que nous avons déterminée, comparée à celle évaluée par certains auteurs (DUNN et coll., 1973). En effet, ces

TABLEAU IX — *Vasopressinémie des rats surrénalectomisés*

Témoins µU/ml	S^{--} + NaCl µU/ml
(< 14,9)	(< 15,3)
6,8	7,8
9,2	13,4
(< 9,6)	(< 11)
15	8,5
11,8	56,9
13,4	31,3
(< 10,6)	(< 7,8)
8,0	20,5
6,1	19,6
(< 8,8)	(< 11,6)
9,5	66,1
	20,5
m ± sm = 9,9 ± 1,1 n = 8	m ± sm = 27,2 ± 6,9 n = 9 t = 2,31, p < 0,05

Les rats surrénalectomisés (S^{--} + NaCl) ont reçu une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. cent comme eau de boisson. Les animaux témoins ont subi un stress opératoire.

Huit jours après l'opération, tous les animaux sont sacrifiés par décapitation et le sang est recueilli sur héparine. Les plasmas de deux rats du même groupe ont été rassemblés pour l'extraction de l'hormone :
n = nombre d'animaux/2. Les valeurs mises entre parenthèses ne sont pas incluses dans la moyenne. Les différences significatives ont été établies selon le test de Student par rapport à la population témoin.

derniers auteurs ont déterminé, chez le Rat, à l'aide d'un dosage radioimmunologique précis et très sensible, un taux plasmatique d'ADH circulant de 2,3 ± 0,9 pg/ml.

Par ailleurs, si l'on considère l'hétérogénéité des valeurs du taux plasmatique d'ADH observée chez les rats surrénalectomisés traités au sodium et du fait que six valeurs sur treize sont proches de celles des témoins, on peut se demander si on a affaire à un hypervasopressinisme permanent. En effet, on peut supposer que l'augmentation de la concentration plasmatique d'ADH observée chez certains animaux résulte de stimuli stressants non spécifiques qui ont eu lieu au moment du sacrifice et qui ont pu paraître inaperçus, l'animal surrénalectomisé répondant à une agression par une libération excessive d'hormone antidiurétique (TRAVIS et SHARE, 1971 ; BURLET et coll., 1972). Aussi, pour éliminer le facteur stress du prélévement sanguin et pour s'assurer de l'existence d'hypervasopressinisme chez les animaux surrénalectomisés soumis à un régime sodé, nous avons mesuré l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique qui est susceptible de refléter assez fidèlement la secrétion hormonale (MILLER et MOSES, 1971 et 1972 ; FRESSINAUD et coll., 1974 ; KHOKHAR et coll., 1975).

b) EVALUATION DE L'EXCRETION URINAIRE DE L'HORMONE ANTIDIURETIQUE

L'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique évaluée par la technique radioimmunologique, à partir d'urines du jour prélevées durant une période de 10 à 12 heures, confirme l'existence d'un hypervasopressinisme après surrénalectomie. Huit jours après l'opération, l'excrétion du peptide neurohypophysaire est environ deux fois supérieure aux valeurs normales (tableau X). L'ensemble de ces résultats montre donc qu'un hypervasopressinisme existe chez ces animaux surrénaloprives en dépit de l'apport sodé fourni avec l'eau de boisson.

c) MODIFICATIONS DU CONTENU EN ADH DES DIFFERENTS TISSUS NERVEUX

- Variations de la teneur en vasopressine de la neurohypophyse

Le contenu en ADH de la neurohypophyse des rats surrénaloprives

TABLEAU X — *Effet de la surrénalectomie sur l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique*

Témoins mU/12 h/100 g	S^{--} + NaCl 7 et 8 jours mU/12h/100 g
0,258	0,255
0,229	0,150
0,158	0,551
0,114	1,07
0,148	1,05
0,275	0,133
0,207	0,363
0,185	0,188
0,218	1,250
0,316	0,251
0,288	0,504
0,229	0,356
0,182	0,364
0,272	0,307
0,149	0,267
0,124	0,553
0,196	
0,307	
0,181	
m ± sm = 0,212 ± 0,014 n = 19	m ± sm = 0,476 ± 0,087 n = 16 t = 3,25 p < 0,005

Les résultats proviennent de dosages effectués au cours de quatre expériences indépendantes.

Les témoins de chaque série expérimentale ne présentaient pas de différences significatives et étaient rassemblés pour l'étude statistique. Ces animaux contrôles ont été soumis à un stress opératoire.

Les animaux privés de surrénales ont reçu comme boisson une solution de chlorure de sdoium à 0,9 p. cent.

m ± sm = moyenne ± erreur standard

Les rats ont été placés par deux dans les cages métaboliques : n = nombre d'animaux / 2 . Les différences significatives ont été établies selon le test de Student par rapport à la population témoin.

TABLEAU XI — *Variations du contenu en hormone antidiurétique de la neurohypophyse du Rat après surrénalectomie*

Animaux	ADH mU/LN	ADH mU/mg
Témoins n = 9	187 ± 10	1320 ± 126
Surrénalectomisés + NaCl n = 14	231 ± 9^{xxx}	1858 ± 122^{xx}

Les animaux témoins ont subi un stress opératoire et tous les rats privés de surrénales ont reçu aussitôt après l'ablation, une solution isotonique de chlorure de sodium en guise de boisson.

Chaque valeur est accompagnée de son erreur standard. La quantité d'ADH (mU/lobe nerveux) ainsi que sa concentration tissulaire (mU/mg de poids sec) sont significativement augmentées 8 jours après la surrénalectomie.

xx : *différence significative pour un seuil de sécurité de 98 p. cent ($p < 0,02$).*

xxx : *différence significative pour un seuil de sécurité de 95 p. cent ($p < 0,05$).*

n = nombre d'animaux

qui ont comme boisson une solution isotonique de chlorure de sodium est augmenté de 40 p. cent huit jours après la surrénalectomie. Que l'on considère la quantité d'ADH présente dans la neurohypophyse ou bien la concentration intratissulaire en hormone de la glande, ces valeurs sont toutes deux accrues (tableau XI).

La figure (17) indique en outre que l'augmentation du taux d'ADH au niveau de la neurohypophyse, chez ces animaux surrénalectomisés, n'est pas observable dès les premiers jours qui suivent l'ablation des surrénales, mais qu'elle persiste au delà de la première semaine.

- Evaluation du contenu en hormone antidiurétique des noyaux supra-optiques et de l'éminence médiane

Dans ces structures, les modifications engendrées par l'absence de surrénales sont moins remarquables. Aucune différence par rapport aux témoins n'est visible au niveau des noyaux supra-optiques ; quant au contenu en ADH de l'éminence médiane, il est accru d'environ 30 p. cent, mais cette augmentation est peu significative (tableau XII).

En somme, dans les conditions expérimentales où les animaux privés de surrénales reçoivent comme apport sodé une solution isotonique de chlorure de sodium, nous avons mis en évidence un hypervasopressinisme accompagné d'une augmentation de la teneur en ADH des tissus nerveux, plus particulièrement de la neurohypophyse.

L'accumulation d'ADH dans la neurohypophyse et l'accroissement simultané de la vasopressinémie montre que la synthèse de l'hormone est accrue chez les animaux surrénalectomisés, traités au sodium et qu'elle est supérieure à sa libération. On est en droit de se demander si l'augmentation de la teneur en ADH de la neurohypophyse persiste chez l'animal surrénalectomisé, non compensé en sodium chez lequel la synthèse et la libération de l'hormone sont en outre sollicitées par un stimulus volume. Il semblait alors intéressant d'apprécier, dans ces conditions, l'importance de l'hypervasopressinisme ainsi que le contenu en hormone des tissus nerveux et de comparer les résultats obtenus à ceux observés précédemment.

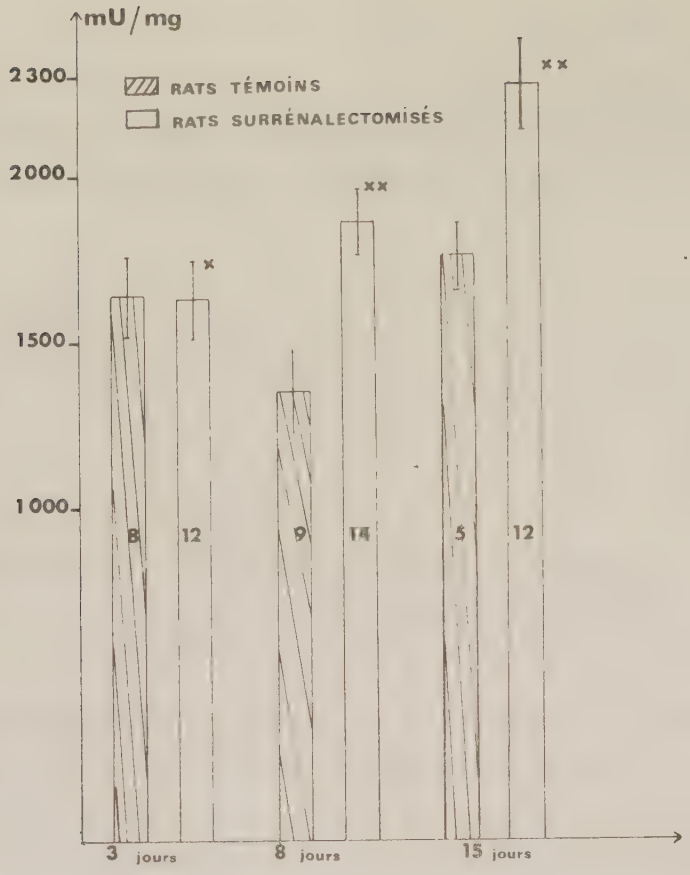


FIGURE 17 — *Augmentation de la concentration en hormone antidiurétique de la neurohypophyse, 3, 8 et 15 jours après surrénalectomie*

Les rats témoins ont subi une opération simulée et les animaux surrénalectomisés ont reçu, comme boisson, une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. cent.

Les chiffres mis à l'intérieur des barres indiquent le nombre d'observations. Le taux moyen neurohypophysaire en hormone, exprimé en mU/mg de poids sec est représenté avec son erreur standard. Les différences ont été établies à l'aide du test du "t" de Student en comparant animaux surrénalectomisés et animaux témoins d'une même série expérimentale.

X : différence non significative
XX : différence significative $p < 0,02$
XXX : différence significative $p < 0,05$

TABLEAU XII

Effet de la surrénalectomie sur le contenu en hormone antidiurétique des noyaux supra-optiques et de l'éminence médiane

Tissus nerveux / Animaux	Noyaux supra-optiques mU/2 NSO	Eminence médiane mU/EM
Témoins n = 7	4,80 ± 0,30	1,15 ± 0,24
Surrénalectomisés + NaCl n = 9	5,66 ± 0,60 n.s.	1,51 ± 0,15 $p < 0,2^{x}$

La valeur moyenne du contenu en ADH de chaque tissus nerveux est accompagné de son erreur standard.

n = nombre d'observations

n.s. : non significatif

x : la différence est seulement significative pour un seuil de sécurité de 80 p. cent.

TABLEAU XIII

Vasopressinémie et contenu en ADH des tissus nerveux chez le Rat surrénalectomisé qui ne reçoit pas de complément en sodium

Animaux	Plasma µU/ml	LN mU/LN	NSO mU/2 NSO	EM mU/EM
Témoins	en moyenne < 13	197 ± 14 N = 6	5,17 ± 1,37 N = 6	6,84 ± 1,24
Surrénalectomisés sans traitement	53,2 ± 21,9	110 ± 8 N = 14 p < 0,001	3,42 ± 0,54 N = 14 p < 0,1	8,71 ± 1,47 n.s.

Les rats privés de surrénales ne reçoivent ni complément en sels, ni corticoïdes. Ils sont sacrifiés huit jours après l'opération.

Les plasmas de deux rats du même groupe sont rassemblés pour l'extraction de l'hormone.

Les valeurs moyennes sont accompagnées de leur erreur standard.

n = nombre d'animaux.

Les différences significatives ont été établies selon le test de Student par rapport à la population témoin.

2 - BILAN DE L'HORMONE ANTIDIURÉTIQUE ÉTABLI CHEZ LE RAT NON COMPENSÉ EN SODIUM

a) DETERMINATION DE LA VASOPRESSINEMIE

Le tableau XIII montre que la concentration plasmatique en ADH des animaux privés de surrénales qui ne reçoivent ni complément en sels, ni corticoïdes est très élevée. Au cours de cette expérimentation, la faible sensibilité du dosage ne nous a pas permis de mesurer la concentration plasmatique des animaux contrôles. Elle est en moyenne inférieure à 13 µU/ml. Mais comparée aux valeurs témoins présentées dans le tableau IX, la vasopressinémie de ces animaux surrénalectomisés est significativement cinq fois plus importante.

b) MODIFICATIONS DU CONTENU EN ADH DES TISSUS NERVEUX

Contrairement à ce que nous avons précédemment observé, le contenu en ADH de la neurohypophyse des rats surrénaloprives non soumis à un régime sodé est très significativement diminué de 44 p. cent huit jours après l'opération (tableau XIV). Une baisse de 34 p. cent de la quantité d'ADH présente au niveau des noyaux supra-optiques est aussi constatée chez ces animaux ; mais dans ce cas, la surrénalectomie ne modifie apparemment pas la teneur en hormone de l'éminence médiane. Dans ces conditions, où les rats ne reçoivent pas de complément en sodium, les changements observés -vasopressinémie accrue et baisse du contenu en hormone de la neurohypophyse- sont analogues à ceux constatés chez le Rat deshydraté : sous l'effet de l'hypovolémie, la secrétion d'ADH étant très importante, les réserves en hormone de la neurohypophyse sont alors mobilisés.

En résumé, dans nos conditions expérimentales, un hypervasopressinisme existe chez l'animal surrénalectomisé recevant ou non un traitement sodé. De plus, l'absence de glucocorticoïdes semblerait particulièrement

se signaler par une augmentation du contenu en ADH de la neurohypophyse. Dans ce cas, la libération de vasopressine ne suit pas le rythme de sa synthèse. Cette observation soulève alors plusieurs questions :

α - les glucocorticoïdes agissent-ils et sur la synthèse et sur la libération d'ADH, mais avec une intensité différente ?

β - ou bien les glucocorticoïdes agissent seulement sur la synthèse d'ADH et l'hypervasopressinisme observé chez ces animaux a une autre origine ?

γ - cet hypervasopressinisme ne serait-il pas alors dû aux troubles du métabolisme hydrominéral secondaires à l'absence de minéralocorticoïdes et persistants malgré l'apport sodé ?

Aussi pour préciser la spécificité d'action des glucocorticoïdes sur la synthèse et la libération d'ADH, nous avons comparé, chez les animaux surrénalectomisés recevant un supplément en sodium, les effets de la dexaméthasone à ceux de l'aldostérone.

C - Effets des corticoïdes sur la secrétion de l'hormone antidiurétique

Le bilan de la vasopressine chez les rats surrénalectomisés depuis huit jours et recevant un régime sodé met en évidence une vasopressinémie plus élevée, associée à une excrétion urinaire plus importante de l'hormone et à une augmentation du taux d'ADH neurohypophysaire. L'excrétion urinaire de l'hormone et la teneur en vasopressine de la neurohypophyse étant très significativement différentes de celles des témoins, nous étudierons plus particulièrement l'effet de l'administration de dexaméthasone ou d'aldostérone sur ces deux paramètres.

TABLEAU XIV

Effets de la dexaméthasone sur l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique du Rat, après surrénalectomie

Témoins		S^{--} + NaCl + Dexa (X)		S^{--} + NaCl + Dexa (XX)	
mU/12 h/100 g	1000 x ADH/créatinine	mU/12 h /100 g	1000 x ADH/créatinine	mU/12 h/100 g	1000 x ADH/Créatinine
0,212	0,216			0,287	0,183
0,182	0,187	0,165	0,117	0,615	0,413
0,272	0,246	0,181	0,183	0,370	0,248
0,149	0,153	0,388	0,272	0,168	0,113
0,124	0,127	0,229	0,211	0,128	0,067
0,395	0,251	0,133	0,051	0,158	0,077
0,100	0,105	0,144	0,063	0,580	0,268
0,170	0,115	0,159	0,076	0,284	0,194
0,200 ± 0,034	0,176 ± 0,021	0,200 ± 0,033	0,139 ± 0,032	0,324 ± 0,066	0,195 ± 0,041
		n.s	n.s	0,1 < p < 0,2	n.s

Cinq jours après la surrénalectomie, les rats ont reçu des injections biquotidiennes, intramusculaires de dexaméthasone (100 µg par 100 g de poids corporel). Les rats témoins ont subi une opération simulée et ont aussi été soumis à des administrations de placebos. Les rats sont placés par deux dans les cages métaboliques (n = nombre d'animaux/2). L'ADH et la créatinine sont évaluées à partir d'urines du jour recueillies après la première injection (x) ou après la cinquième injection, au cours du troisième jour de traitement (xx).

m ± sm = moyenne ± erreur standard

n.s. = différence non significative par rapport à la population témoin

1 - EFFET DE LA DEXAMÉTHASONE

a) EXCRETION URINAIRE DE L'HORMONE ANTIDIURETIQUE AU COURS DU TRAITEMENT

Une seule injection de dexaméthasone (100 µg/100 g de poids corporel) à des animaux privés de surrénales depuis cinq jours supprime l'augmentation de l'excrétion de l'hormone antidiurétique observée habituellement après surrénalectomie. En effet, la quantité d'hormone antidiurétique excrétée par ces animaux est tout à fait comparable à celle excrétée par les animaux témoins (tableau XIV). Au cours du troisième jour de traitement, à la suite de la cinquième injection de dexaméthasone, l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique des animaux surrénalectomisés traités est de 50 p. cent supérieure à celle des animaux intacts. Cette différence présente une signification limitée ($p < 0,2$) lorsque l'on compare les animaux surrénalectomisés traités aux animaux témoins présentés dans le tableau XIV. Mais lorsque l'on confronte les résultats des tableaux X et XIV, on constate que l'excrétion urinaire de l'ADH des deux populations contrôles ne diffère pas de manière appréciable ; dans ce cas, comparés à l'ensemble des rats témoins, les animaux surrénalectomisés, traités durant trois jours à la dexaméthasone excrètent une quantité d'ADH très significativement supérieure à la normale ($p < 0,005$). De plus, l'excrétion hormonale de ces animaux auxquels on a administré pendant plusieurs jours de la dexaméthasone, ne diffère pas significativement de celle des animaux surrénalectomisés ne recevant aucune corticothérapie.

Cependant, sous l'effet de la dexaméthasone, la filtration glomérulaire des rats traités augmente en moyenne de 54 p. cent (voir chapitre IV). Aussi, pour que l'excrétion d'ADH reflète plus précisément la teneur du plasma en hormone, il est préférable d'exprimer la quantité d'ADH excrétée par rapport aux taux d'urines filtrées. On observe alors que les rapports ADH/créatinine mesurés à partir d'urines de rats surrénalectomisés, traités durant trois jours à la dexaméthasone, sont comparables à ceux trouvés chez les rats témoins (tableau XIV). Ceci suppose une vasopressinémie normale chez les animaux surrénalectomisés soumis à des injections de glucocorticoïdes, malgré l'excrétion accrue de l'hormone.

TABLEAU XV

Contenu en vasopressine du lobe nerveux de rats surrénalectomisés et traités durant trois jours à la dexaméthasone

ANIMAUX / LOBES NERVEUX (LN)	TEMOINS	S⁻⁻ + NaCl + Dexa
m ± sm mU/LN	186 ± 15	216 ± 9 p < 0,1
m ± sm mU/mg	1406 ± 54 n = 7	1318 ± 102 n = 12 n.s.

Cinq jours après la surrénalectomie, les animaux reçoivent des injections biquotidiennes intramusculaires de dexaméthasone (100 µg/100 g de poids corporel). Aux animaux témoins qui ont subi une opération simulée, on administre un volume égal d'une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. cent (0,1 ml/100 g de poids corporel).

m ± sm = moyenne ± erreur standard

n.s. = différence non significative par rapport à la population témoin

b) CONTENU EN ADH DE LA NEUROHYPOPHYSE APRES ADMINISTRATIONS REPETEES DE DEXAMETHASONE

L'évaluation des réserves en ADH de la neurohypophyse de ces animaux montre qu'après trois jours de traitement, à la suite de la septième injection, le contenu en hormone reste légèrement supérieur de 10 p. cent, comparé à celui des animaux témoins ; cependant la concentration tissulaire en hormone exprimée par mg de poids sec est analogue dans les deux groupes d'animaux (tableau XV). L'accumulation d'ADH visible après 8 jours de surrénalectomie n'apparaît pas (ou peu) lorsque les rats reçoivent des glucocorticoïdes.

2 - EFFETS DE L'ALDOSTÉRONE

Les animaux ont été soumis à un traitement à l'aldostérone (injections de 12,5 µg d'aldostérone par 100 g de poids corporel) suivant un protocole identique à celui décrit pour la dexaméthasone. Au cours de ce traitement, l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique a été déterminée, comme précédemment, d'une part après une seule injection d'aldostérone et d'autre part au cours du troisième jour de traitement, après la cinquième injection. En outre, le contenu en hormone du lobe nerveux a été évalué après la septième administration du stéroïde.

a) EXCRETION DE L'HORMONE ANTIDIURETIQUE AU COURS DU TRAITEMENT

Le tableau XVI montre que la quantité d'ADH présente dans les urines recueillies après la première et la cinquième administration d'aldostérone n'est pas significativement différente de celle observée dans les urines des animaux témoins. L'aldostérone corrige donc aussi l'excrétion accrue d'ADH observée chez l'animal surrénalectomisé.

TABLEAU XVI

Effets de l'aldostérone sur l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique du Rat après surrénalectomie

TEMOINS		S^{--} + NaCl + Aldo (x)		S^{--} + NaCl + Aldo (xx)	
mU/12 h/100g	1000 x ADH/créatinine	mU/12 h/100g	1000 x ADH/créatinine	mU/12 h/100g	1000 x ADH/créatinine
0,100	0,133	0,107	0,071	0,125	0,129
0,196	0,153	0,150	0,136	0,205	0,311
0,178	0,124	0,179	0,078	0,434	0,186
0,098	0,082	0,055	0,041	0,052	0,054
0,088	0,055	0,104	0,070	0,088	0,107
0,107	0,073	0,089	0,063	0,148	
0,125	0,094	0,100	0,053	0,087	0,124
		0,121	0,098	0,106	0,070
		0,081	0,065	0,096	0,079
0,127 ± 0,016	0,102 ± 0,013	0,098 ± 0,012 n.s	0,075 ± 0,010	0,149 ± 0,038 n.s	0,132 ± 0,029

Les rats privés de surrénales depuis cinq jours ont reçu des injections intramusculaires d'aldostérone (12,5 µg/100 g de poids corporel) deux fois par jour.

L'ADH et la créatinine ont été mesurées dans les urines émises après la première injection (x) ou après deux jours de traitement à la suite de la cinquième injection (xx).

n.s. : différence non significative par rapport à la population témoin

b) CONTENU EN ADH DE LA NEUROHYPOPHYSE

Au cours de deux séries expérimentales consécutives, le contenu en ADH des lobes nerveux des animaux surrénalectomisés, traités à l'aldostérone, bien qu'apparemment diminué, ne diffère pas de manière significative de celui des rats contrôles (tableau XVII).

Chez les animaux témoins de ces séries expérimentales, l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique est inférieure à celle évaluée habituellement chez les rats contrôles. Il en est de même pour le contenu neurohypophysaire en ADH de ces animaux. Nous ne pouvons expliquer une telle variation. Cependant la secrétion de l'hormone antidiurétique est soumise à un certain nombre de facteurs difficilement contrôlables ; en particulier des variations saisonnières de la secrétion d'ADH peuvent être envisagées. C'est pourquoi chaque groupe d'animaux expérimentaux comprend un certain nombre de témoins provenant du même arrivage et soumis au même conditionnement.

En résumé, nous pouvons remarquer que dans nos conditions expérimentales, la dexaméthasone et l'aldostérone corrigent l'hypervasopressinisme et empêchent aussi l'accumulation de l'hormone dans la neurohypophyse. Notons cependant que si après une seule administration de dexaméthasone, l'excrétion urinaire de l'ADH revient aux valeurs normales, elle augmente à nouveau après trois jours de traitement.

E - DISCUSSION

Les différents dosages plasmatiques et urinaires de l'hormone antidiurétique mettent en évidence l'existence d'un hypervasopressinisme chez les rats surrénalectomisés qui reçoivent ou non un traitement compensateur en sodium.

Chez les rats privés de surrénales et exempts de traitement en sodium, l'hypervasopressinisme observé provient en grande partie de l'hypovolémie consécutive aux pertes sodées. Chez ces animaux, la vasopressinémie importante est accompagnée d'une diminution de la teneur en hormone antidiurétique du lobe nerveux. Le contenu en ADH des éminences médianes de ces

TABLEAU XVII — *Contenu en vasopressine du lobe nerveux de rats surrénalectomisés et traités durant trois jours à l'aldostérone*

ANIMAUX / LOBES NERVEUX (LN)	TEMOINS	S^{--} + NaCl + Aldo
1ère expérience	n = 4	n = 7
m ± sm mU/LN	174 ± 21	141 ± 11 t = 1,59 (n.s)
m ± sm mU/mg	1062 ± 129	953 ± 102 t = 0,6 (n.s)
2ème expérience	n = 10	n = 10
m ± sm mU/LN	113 ± 8	88 ± 15 t = 1,49 (n.s)
m ± sm mU/mg	903 ± 74	759 ± 107 t = 1,11 (n.s)

Les animaux surrénalectomisés reçoivent, 5 jours après l'opération, des injections intramusculaires d'aldostérone (12,5 µg/100 g de poids corporel). On injecte aux animaux témoins qui ont subi un stress opératoire un volume égal d'une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. cent (0,12 ml/100 g de poids corporel).

m ± sm = moyenne ± erreur standard

n.s. = non significatif par rapport à la population témoin

animaux n'est pas modifié, mais celui des noyaux supra-optiques présente une diminution de 34 p. cent. Une baisse en hormone de la neurohypophyse a déjà été souvent remarquée au cours de certaines situations dans lesquelles des quantités importantes d'hormone sont secrétées, en particulier au cours d'expériences de deshydratation (DIAMOND, 1956 ; JONES et PICKERING, 1969 ; VILHARDT, 1970 ; BURLET et coll., 1973). Des variations de la teneur en ADH des structures hypothalamiques ont aussi été constatées dans des circonstances analogues ; en effet, une diminution du contenu en ADH des noyaux supra-optiques a été observée par GÜZEK et LESNIK (1968) chez le Cobaye après une déshydratation de cinq jours et par VILHARDT (1970) chez le Rat privé d'eau durant une période de dix jours. De plus GÜZEK et coll. (1969) ont mesuré une augmentation du flux hormonal intra-axonique lors d'une perfusion de solution sodée hypertonique.

En revanche, chez les rats surrénaloprives qui reçoivent une solution isotonique de chlorure de sodium en eau de boisson, l'hypervasopressinisme est accompagné d'une augmentation de la teneur en vasopressine du lobe nerveux. La concomitance entre la concentration plasmatique élevée d'ADH et la quantité accrue d'hormone présente dans la neurohypophyse indique que la synthèse de la vasopressinémie est plus particulièrement augmentée chez ces animaux. En outre, les résultats du tableau (XIII) montrent (avec une signification statistique limitée) que le contenu en ADH de l'éminence médiane augmente d'environ 30 p. cent. Ceci peut être le reflet du déplacement de la vasopressine (liée à sa protéine porteuse, la neurophysine) le long du tractus hypothalamo-neurohypophysaire : plus activement synthétisée, une quantité plus importante d'ADH s'acheminerait vers l'hypophyse.

En résumé, la confrontation des résultats des deux séries expérimentales, l'une composée de rats surrénalectomisés recevant comme eau de boisson une solution isotonique de chlorure de sodium et l'autre formée d'animaux surrénalectomisés ne recevant aucun traitement, montre que l'absence de surrénales stimule la synthèse et la libération de l'hormone. Dans le premier cas, lorsque la vasopressinémie est moins augmentée, le taux de production élevé est en outre visualisé par une accumulation de l'hormone dans le lobe nerveux ; dans le second cas, où les stimuli pression-volume libérateurs d'ADH sont intenses, la quantité d'ADH secrétée n'est pas comblée par l'augmentation de sa synthèse.

Depuis plusieurs années une augmentation de la concentration en ACTH du plasma ainsi que des modifications du contenu en hormone du lobe antérieur de l'hypophyse ont aussi été mises en évidence chez le Rat après surrénalectomie (COX et coll., 1958 ; HODGE, 1960). Les effets opposés de la surrénalectomie et des traitements aux hormones corticosurrénaliennes sont maintenant bien établis et admettent une action rétroactive des glucocorticoïdes sur la secrétion d'ACTH (Rev. FORTIER, 1966). Récemment des techniques de dosage plus fines ont confirmé ces données et précisé les variations du contenu en ACTH de l'adénohypophyse. Dans les premiers jours qui suivent la surrénalectomie, DALLMAN et coll. (1973) ont montré une diminution du contenu en corticotrophine de l'adénohypophyse ainsi qu'une augmentation de sa concentration plasmatique. Cependant, un mois après la surrénalectomie, une augmentation de la teneur en ACTH de la glande a été mise en évidence par MARCEAU et coll. (1972) ; cet auteur suggère alors que les glucocorticoïdes exercent un effet prépondérant sur la synthèse de l'hormone. L'évolution en fonction du temps du contenu en ACTH de l'adénohypophyse a été confirmée dernièrement par BUCKINGHAM et HODGES (1974). En effet, ces auteurs ont montré que le contenu en ACTH de la glande diminuait aussitôt après la surrénalectomie, mais augmentait par la suite pour atteindre des valeurs 4 à 5 fois supérieures à la normale 15 jours après l'ablation.

La production accrue d'hormone antidiurétique, chez des rats surrénalectomisés qui reçoivent un traitement en sodium vient à l'appui de l'hypothèse d'AHMED et coll. (1967) qui supposent que les glucocorticoïdes exercent une action inhibitrice sur la synthèse de l'hormone antidiurétique ; l'absence de leur effet rétroactif au niveau hypothalamique serait selon ces auteurs à l'origine de l'hypervasopressinisme observé.

Cependant, les modifications de l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique (qui représentent les variations de libération de l'hormone) sous l'influence de l'aldostérone ou de la dexaméthasone repose le problème de l'origine de l'hypervasopressinisme observé chez ces animaux. En effet, dans nos conditions expérimentales, l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique redevient normale aussi bien après une seule administration d'aldostérone que de dexaméthasone ; de plus, alors que l'excrétion du peptide neurohypophysaire est maintenue normale par des administrations répétées

d'aldostérone, elle tend à s'élever à nouveau au cours du troisième jour de traitement à la dexaméthasone ; elle est dans ce cas, d'environ 50 p. cent supérieure à celle des témoins et n'est pas statistiquement différente de celle des animaux surrénalectomisés.

Les doses de minéralocorticoïdes et de glucocorticoïdes employées au cours de ces traitements sont hautement pharmacologiques (12,5 µg/100 g de poids corporel pour l'aldostérone et 100 µg/100 g pour la dexaméthasone). Utilisée à de telles doses, il n'est pas impossible que l'aldostérone présente des propriétés glucocorticoïdes. D'autre part, des doses allant de 25 µg à 600 µg de dexaméthasone pour 100 g de poids corporel sont souvent employées pour inhiber la secrétion du CRF ou la libération d'ACTH au cours de diverses agressions (MIAHLE - VOLOSS et coll., 1967 ; DALLMAN et YATES, 1968) ; selon TAKEBE et coll. (1971), 250 µg de dexaméthasone (par 100 g) sont nécessaires pour empêcher durant 3 à 12 heures l'augmentation de l'activité CRF de l'éminence médiane consécutive aux agressions. Par contre, des quantités analogues ou même inférieures de ce glucocorticoïde (6,25 µg/100 g), provoquent, chez le Rat intact ou surrénalectomisé, des perturbations de la diurèse en augmentant l'excrétion de l'eau et des électrolytes (cf. chapitre IV et CHABRIA et GAITONDE, 1966).

Dans ces conditions, on peut en effet concevoir que l'aldosterone agit par ses propriétés glucocorticoïdes ; elle est cependant susceptible d'intervenir au niveau de la secrétion d'ADH, chez nos animaux surrénalectomisés, par ses propriétés habituelles de minéralocorticoïde. En effet, si après administration d'aldostérone, l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique redevient normale, on peut penser que l'hypervasopressinisme observé chez les animaux surrénalectomisés est dû à la contraction des espaces extracellulaires consécutive aux pertes sodées insuffisamment corrigées par l'apport de sels fourni avec l'eau de boisson : dans ce cas, l'aldostérone, grâce à son pouvoir minéralocorticoïde, supprimerait le "stimulus volume" libérateur d'ADH. Plusieurs observations vont dans le sens d'une telle hypothèse :

- Après huit jours de surrénalectomie et malgré l'apport sodé, les animaux perdent environ 10 p. cent de leur poids corporel. Cependant, cette perte de poids ne représente pas uniquement la diminution des volumes liquidiens, elle est probablement aussi la conséquence des déficiences organiques du métabolisme glucidique et protéïque.

- En outre, l'activité rénine plasmatique (évaluée au laboratoire selon un procédé radioimmunologique par C. MARTINEAUX) est très augmentée chez les animaux privés de surrénales bien que recevant un apport sodé permanent avec l'eau de boisson. Un traitement à l'aldostérone diminue l'activité rénine ; celle-ci, bien qu'élevée, n'est pas, en raison de la dispersion des résultats, significativement différente de celle des témoins.

A la suite de cette dernière constatation, il semble alors probable que la libération accrue d'ADH observée chez les animaux surrénalectomisés recevant une solution isotonique de chlorure de sodium en guise de boisson est aussi en partie due à des modifications de la volémie ; et bien qu'aux doses employées l'aldostérone puisse intervenir par ses propriétés glucocorticoïdes, il est plus vraisemblable que dans ces conditions elle agit en normalisant la volémie.

Cependant, une seule injection de dexaméthasone (qui ne corrige pas les troubles électrolytiques) ramène à la normale l'excrétion du peptide neurohypophysaire. Les glucocorticoïdes sont donc aussi capables d'empêcher la libération d'ADH. On est alors amené à se demander comment la dexaméthasone intervient. Elle ne peut agir en supprimant les stimuli volémiques ; en effet, si MOSES (1965) a montré que la méthylprédnisolone augmentait chez le Rat intact la volémie et le contenu en eau des cellules aux dépens des espaces interstitiels, il s'avérait incapable au cours de ses expériences de restaurer, par un traitement aux glucocorticoïdes, l'hypovolémie observée chez les rats surrénalectomisés. Mais, par analogie avec l'action inhibitrice des glucocorticoïdes sur la libération d'ADH en réponse à différents types d'agression on est en droit de se demander si dans nos conditions expérimentales, la dexaméthasone agit en empêchant la libération du peptide neurohypophysaire provoquée par le stimulus volume (bien que jusqu'à présent aucune expérience ne l'ait vraiment démontré). Les observations d'AUBRY et coll. (1965) pourraient aussi être en faveur d'une action inhibitrice des glucocorticoïdes sur la libération de l'ADH. Ces auteurs montrent, en effet, que le seuil osmotique auquel l'ADH est libérée, augmente, chez l'homme, à la suite d'un traitement à l'hydrocortisone. Mais, il n'a pu être démontré avec certitude si cette élévation est due à une expansion des volumes extracellulaires ou à une augmentation des substances osmotiquement actives présentes

dans les osmorécepteurs ou bien à un effet direct des glucocorticoïdes sur la libération du peptide neurohypophysaire.

Au cours du troisième jour de traitement, à la suite de la cinquième injection de dexaméthasone l'excrétion urinaire de l'hormone antidiurétique augmente à nouveau. Si l'on admet que le catabolisme de l'ADH n'est pas modifié par le traitement, l'augmentation de l'excrétion de l'hormone reflète alors une libération accrue d'ADH à partir de la neurohypophyse ; corrigée par une seule administration de dexaméthasone la secrétion de l'ADH s'élève à nouveau malgré les injections répétées de ce glucocorticoïde. Aussi, comme nous l'avons fait remarquer précédemment, la dexaméthasone employée à des doses pharmacologiques provoque des perturbations du métabolisme hydrominéral. On observe en effet chez ces animaux une diurèse saline entraînant une fuite d'eau élevée (voir chapitre IV) avec une diminution du poids de l'animal. On peut alors supposer que ces pertes exagérées d'eau induisent secondairement une augmentation de la libération d'ADH.

En considérant l'action biphasique de la dexaméthasone on peut supposer que ce glucocorticoïde inhibe la secrétion d'ADH durant les premières heures qui suivent l'injection, et que lorsque la dexaméthasone est en partie disparue de la circulation, la libération d'ADH s'élève à nouveau. L'augmentation est d'autant plus importante que les stimuli sont intenses ; ainsi cette augmentation n'apparaît qu'au cours du troisième jour de traitement en réponse aux pertes excessives d'eau, alors qu'il n'est pas possible de s'en rendre compte à la suite de la première administration. Par ailleurs, LUTZ et coll. (1973) ont montré que le taux plasmatique d'ADH circulante diminue après une seule injection de dexaméthasone.

Si à la suite de ces dernières observations, il est vraisemblable qu'il persiste, chez les animaux surrénalectomisés, malgré l'apport sodé fourni avec l'eau de boisson, des troubles de la volémie responsables de la secrétion accrue d'ADH, néanmoins d'autres facteurs intervenant dans la libération du peptide neurohypophysaire ne peuvent être éliminés. En effet, il est maintenant bien admis que l'animal surrénalectomisé répond à un "stress" en libérant plus d'ADH que ne le fait un animal intact (TRAVIS et SHARE, 1971 ; BURLET, 1972). En tenant compte de ces données, on peut alors supposer qu'une partie de l'ADH excédentaire secrétée par ces animaux est à mettre sur le

compte de stimuli stressants qui ont pu survenir au cours du prélèvement urinaire. Comme nous l'avons déjà fait remarquer les glucocorticoïdes sont capables de freiner la libération d'ADH consécutive à divers types d'agression en outre, il est possible qu'aux doses employées, l'aldostérone présente des propriétés glucocorticoïdes lui permettant aussi d'intervenir à ce niveau.

Par conséquent, il est difficile de tirer des conclusions définitives de ces expérimentations réalisées avec des doses incontestablement pharmacologiques de ces deux corticoïdes. Aussi l'ensemble de ces résultats ne nous permet pas d'apporter d'éclaircissement sur le rôle proprement physiologique des glucocorticoïdes sur la libération de l'hormone antidiurétique dans les conditions normales.

Si l'augmentation de la libération d'ADH chez les animaux surrénalectomisés peut être due à des stimuli volémiques ou stressants, par contre, l'accumulation de l'hormone au niveau neurohypophysaire reflète une synthèse accrue due à l'absence de glucocorticoïdes. En effet, un traitement de trois jours à l'aldostérone ou à la dexaméthasone à des rats surrénalectomisés depuis cinq jours empêche l'augmentation du contenu en ADH de la neurohypophyse observable chez le Rat privé de surrénales depuis une semaine. Puisque l'accumulation d'ADH dans la neurohypophyse n'apparaît pas après traitement, les deux corticoïdes dexaméthasone et aldostérone sont donc capables d'en freiner la production. La dexaméthasone étant incapable de corriger les troubles hydriques, il est évident que ce stéroïde de synthèse agit par ses propriétés glucocorticoïdes ; aux doses pharmacologiques employées, on ne peut totalement exclure une activité glucocorticoïde de l'aldostérone.

Mais nos expériences ne permettent pas de dire qu'à la suite de ces traitements, la synthèse de l'hormone s'effectue tout à fait normalement. Au contraire, dans le cas de la dexaméthasone, si l'on considère que l'augmentation de l'excrétion urinaire d'ADH reflète une secrétion accrue, et du fait que le contenu en ADH du lobe nerveux n'est pas modifié, la synthèse de l'hormone s'effectue à nouveau à un rythme supérieur à la normale après trois jours de traitement probablement sous l'effet de stimuli périphériques.

CHAPITRE TROISIEME

EFFETS DE LA SURRENALECTOMIE ET DES CORTICOIDES SUR L'ACTIVITE DE L'ADENYL-CYCLASE DE REIN DE RAT SENSIBLE A L'HORMONE ANTIDIURETIQUE

EFFETS DE LA SURRÉNALECTOMIE ET DES CORTICOÏDES SUR L'ACTIVITÉ DE L'ADÉNYL-CYCLASE DE REIN DE RAT SENSIBLE À L'HORMONE ANTIDIURÉTIQUE

A - INTRODUCTION

L'action des hormones surrénaliennes et neurohypophysaires au niveau du rein est complexe. Des méthodes très diversifiées, allant de la simple détermination des électrolytes urinaires aux techniques plus fines de la microponction en passant par l'utilisation des systèmes "in vitro" constitués par la peau et la vessie des Amphibiens ont permis d'approcher ou de préciser l'action des hormones surrénaliennes et neurohypophysaires sur le transport de l'eau et des électrolytes au niveau du rein (Rev. : JARD, 1971 ; SHARE et LEAF, 1973).

Chez les mammifères, les minéralocorticoïdes, l'aldostérone en particulier, réglent le transport du Na^+ et du K^+ (BARGER et coll., 1958 ; GANONG et MULROW, 1958 ; VANDER et coll., 1958 ; YUNIS et coll., 1964 ; HIERHOLZER et coll., 1965 ; MURAYAMA et coll., 1968), tandis que la vasopressine agit sur le flux osmotique de l'eau en augmentant la perméabilité des tubules distaux et des canaux collecteurs (WIRZ, 1956 ; GOTTSCHALK et MYLLE, 1959 ; ULLRICH et coll., 1964 ; GRANTHAM et BURG, 1966). Les glucocorticoïdes semblent au contraire les imperméabiliser (STOLTE et coll., 1968).

A l'heure actuelle, le mécanisme d'action cellulaire de ces différentes hormones fournit matière à un grand nombre d'études.

Dans le cas particulier des hormones corticosurrénaliennes, un certain nombre de travaux montre qu'elles suivent le modèle général proposé pour toutes les hormones stéroïdiennes. Ce modèle schématise le phénomène par un processus en trois étapes :

α : dans un premier temps, l'hormone circulante diffuse à travers la membrane cellulaire, puis se fixe sur les récepteurs spécifiques du cytoplasme.

β : ensuite, le complexe hormone-récepteur réagit avec le génome, ce qui modifie alors la transcription et entraîne la synthèse d'une nouvelle protéine.

γ : enfin, la protéine nouvellement induite intervient comme médiateur de la réponse physiologique.

Cette suite d'événements implique une réponse tardive et prolongée.

Bien que, jusqu'à présent, les tentatives expérimentales d'une démonstration directe de l'augmentation de la synthèse des acides ribonucléiques et des protéines, sous l'influence de l'aldostérone, n'aient pas été couronnées de succès, l'emploi judicieux d'inhibiteurs de ces synthèses (actinomycine D, cordycepine et cycloheximide) apporte des arguments incontestables en faveur de l'action de l'aldostérone par l'intermédiaire d'une biosynthèse protéique (Rev. : FELDMAN et coll., 1972). En outre, la présence dans le rein de récepteurs cytoplasmiques et nucléaires spécifiques de l'aldostérone est maintenant démontrée de manière indubitable (MARVER et coll., 1972 ; ROUSSEAU et coll., 1972 ; CORVOLet coll., 1973). Si la protéine dont la synthèse est sous l'influence de l'aldostérone n'a pas encore été identifiée, son rôle dans le transport du sodium a, par contre, fait l'objet de nombreuses études. Rappelons que, selon le schéma de KOEFOED-JOHNSEN et USSING (1958), le mouvement du sodium à travers les tissus épithéliaux comporte, en premier lieu, la pénétration passive de l'ion dans la cellule au pôle apical de la cellule, dans le sens du gradient électrochimique ; cette étape est alors suivie de l'expulsion active du sodium, hors des cellules, par les "pompes" à travers les membranes basales et latérales. Dans une telle perspective, on conçoit que les agents capables de modifier le transport du sodium exercent cet effet en influençant soit l'entrée de l'ion au pôle apical, soit sa prise en charge par la "pompe" aux autres niveaux. La "pompe à sodium" est considérée comme représentée par le système enzymatique Na^+ - K^+ ATPase associé à la membrane cellulaire, capable d'hydrolyser l'adénosine triphosphate en présence de concentrations appropriées de sodium et de potassium. Trois théories ont alors été émises pour expliquer l'action de l'aldostérone :

α - l'aldostérone agirait au pôle apical de la cellule et la protéine induite par l'aldostérone jouerait le rôle de perméase : théorie de la perméase".

β - l'aldostérone affecterait directement le système enzymatique $Na^+ - K^+$ ATPase : "théorie de la pompe".

γ - l'aldostérone exercerait une action sur la synthèse d'enzymes intervenant dans l'apport d'énergie nécessaire au fonctionnement de la pompe à sodium : "théorie métabolique".

Les différents résultats obtenus à la suite de nombreuses expérimentations n'ont pu jusqu'à présent faire l'unanimité autour d'une même théorie. Cependant, des expériences récentes (HILL et coll., 1973 ; CRABBE, 1973) sembleraient donner crédit à la première théorie, impliquant que l'aldostérone agit en stimulant l'entrée du sodium au niveau du pôle apical de la cellule cible.

Les études relatives au mécanisme d'action cellulaire des glucocorticoïdes au niveau rénal sont récentes. Les travaux de FUNDER et de ses collaborateurs ont démontré l'existence de récepteurs rénaux cytosoliques spécifiques de la corticostérone et de la dexaméthasone. Mais à ce niveau les recherches concernant les étapes ultérieures à cette fixation hormonale n'ont pas encore reçu de support expérimental. Cependant, dans un certain nombre de tissus, les glucocorticoïdes augmentent ou permettent l'action d'autres hormones qui agissent en stimulant la formation d'AMP cyclique (FRIEDMAN et coll., 1967 ; SCHAEFFER et coll., 1969 ; MANGANIELLO et coll., 1972 a et b). Selon certains auteurs, ces actions permissives ou facilatrices des glucocorticoïdes peuvent s'expliquer par une diminution de l'activité de l'AMP cyclique phosphodiestérase, enzyme favorisant la transformation d'AMP cyclique en 5' AMP inactif.

L'augmentation, par la vasopressine, de la perméabilité osmotique à l'eau des cellules épithéliales du tube distal et des canaux collecteurs du rein résulte par contre d'un mécanisme fondamentalement différent. Depuis les travaux de BROWN et coll. (1963) et surtout de GRANTHAM et BURG (1966), il est généralement admis que l'AMPcyclique est le second messager de l'action antidiurétique de la vasopressine. L'hormone antidiurétique agit en stimulant l'adényl-cyclase, enzyme qui catalyse la formation d'AMPcyclique à partir d'ATP. L'activation par la vasopressine de l'adényl-cyclase présente dans les membranes de medulla du rein a été démontrée chez de nombreuses espèces (ANDERSON et BROWN, 1963 ; BROWN et coll., 1963 ; CHASE et AURBACH, 1968 ; DOUSA et HECHTER, 1970 ; DOUSA et coll., 1970-1971 ; MARUMO et EDELMAN, 1971 ; FORTE, 1972 ; BIRNBAUMER et YANG, 1974). L'étape initiale précédant la sti-

mulation de cette enzyme membranaire implique la liaison de l'hormone à des sites récepteurs spécifiques reliés au système adényl-cyclasique. En 1973, BOCKAERT et coll. (a et b) ont mis en évidence, sur les membranes plasmiques de medulla interne de rein de Porc, la présence de récepteurs à haute affinité (Km voisin de 10^{-9} M), spécifiques de la lysine-vasopressine et impliqués dans l'activation de l'adényl-cyclase vasopressine dépendante. Ces auteurs ont en outre étudié les relations existant entre l'occupation de ces sites récepteurs par l'hormone et la stimulation de l'enzyme par l'hormone, étape encore mal connue que l'on appelle couplage.

Sur la peau et la vessie des Amphibiens, les hormones neurohypophysaires augmentent non seulement la perméabilité osmotique à l'eau, mais favorisent aussi la réabsorption du sodium. Il est également bien démontré que l'AMPcyclique est l'intermédiaire intracellulaire de ces deux effets, tant sur la vessie (ORLOFF et HANDLER, 1961-1962 ; PETERSON et EDELMAN, 1964 ; BOURGUET, 1968) que sur la peau des Amphibiens (BABA et coll., 1967 ; BASTIDE et JARD, 1968).

Les mécanismes par lesquels l'AMPcyclique entraîne une stimulation du transport actif du sodium et une augmentation de la perméabilité osmotique à l'eau de ces structures épithéliales ne sont pas encore élucidés. Cependant, une protéine kinase activée par l'AMPcyclique a été mise en évidence dans les cellules de la vessie de grenouille (JARD et BASTIDE, 1970 ; KIRSCHBERGER et coll., 1971) et dans le rein des mammifères (KUO et GREENGARD, 1969 ; DOUSA et coll., 1971). Cette enzyme activable par de faibles concentrations du nucléotide cyclique (10^{-8} M à 10^{-7} M) catalyse la phosphorylation de différentes protéines, comme l'histone, la protamine et la caséine ; la faible spécificité de la protéine kinase permet facilement sa détection, mais son substrat physiologique n'est pas encore connu. L'étape suivant cette phosphorylation protéique suppose, selon DOUSA et coll. (1972), la présence d'une protéine phosphatase qui ramènerait à l'état initial les protéines phosphorylées de la membrane plasmique. DELORENZO et coll. (1973) ont montré que l'AMP cyclique augmentait la déphosphorylation de certaines protéines présentes dans les fractions membranaires de la vessie de Crapaud. Cependant, cette propriété n'a pas été retrouvée dans le rein de mammifères (BARNES et coll., 1975). La distribution subcellulaire des enzymes intervenant dans le mécanisme d'action de l'hormone antidiurétique au niveau du rein a récemment été étudiée par BARNES et coll. (1975) : l'adényl-cyclase vasopressine dépendante était bien entendue trouvée dans les membranes plasmiques tandis que l'AMPcyclique phosphodiesté-

rase, enzyme qui catalyse la destruction de l'AMPcyclique en 5' AMP inactif se rencontre dans le cytosol. L'activité protéine-kinase stimulée par l'AMP-cyclique et l'activité protéine-phosphatase sont aussi présentes dans les fractions cytosoliques, alors que ces enzymes sont supposées agir au niveau des membranes apicales des cellules épithéliales. Si la protéine-kinase et la protéine-phosphatase interviennent effectivement dans le mécanisme d'action de l'hormone antidiurétique, il faut admettre, selon les auteurs, qu'avant d'agir, ces enzymes solubles sont transportées vers leur substrat par l'intermédiaire d'un système cytoplasmique, probablement les microtubules. Ces structures seraient alors détruites au cours de la préparation de l'extrait tissulaire, libérant ainsi les substances enzymatiques étudiées. Pour argumenter cette hypothèse, les auteurs font remarquer que les microtubules nombreux dans les cellules des canaux collecteurs présentent une disposition parallèle aux membranes cellulaires et que l'intégrité de leur constitution est indispensable au mécanisme d'action de l'hormone antidiurétique (TAYLOR et coll., 1973 ; DOUSA et BARNES, 1974).

Par ailleurs, les réponses biologiques de l'hormone antidiurétique sont susceptibles d'être modifiées par un certain nombre de substances physiologiques (les corticoïdes, les prostaglandines, les catécholamines) et d'agents pharmacologiques (la valinomycine, le probenicide, la chlorpropamide). Ces produits peuvent intervenir à différentes étapes du processus d'action de la vasopressine : ils peuvent interférer à un stade précédant la formation d'AMP cyclique ou à un stade ultérieur.

HANDLER et coll. (1969) ont mis en évidence une influence stimulatrice des corticoïdes (minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes) vis-à-vis des activités hydroosmotiques et natriferiques de la vasopressine au niveau de la vessie de Crapaud. Ces auteurs ont en outre montré que l'aldostérone était aussi capable d'augmenter ces deux actions lorsqu'elles sont induites par l'AMP cyclique. Dans ce cas, le stéroïde surrénalien agirait à une étape ultérieure à l'activation de l'adényl-cyclase. Par la suite, STOFF et coll. (1972) ont clairement établi que l'action permissive de l'aldostérone était la conséquence d'une diminution de la vitesse de dégradation du nucléotide cyclique intracellulaire ; cet effet était probablement lié à une activité moins importante de la 3' - 5' AMP cyclique phosphodiestérase. Si ces auteurs démontrent parfaitement bien que l'aldostérone agit à une étape ultérieure à la formation d'AMP cyclique, aucune preuve expérimentale n'est apportée

pour expliquer l'influence de la dexaméthasone sur les réponses à la vasopressine de la vessie de Crapaud.

La réponse du rein de mammifères à l'hormone antidiurétique est aussi influencée par la présence de corticoïdes. Non seulement l'aldostérone modifie la réponse à l'ADH en agissant sur l'hypertonie papillaire, mais certaines expériences suggèrent que les glucocorticoïdes interviennent aussi dans le mécanisme de concentration de l'urine "in vivo" ; selon SIGLER et coll. (1965) la présence de glucocorticoïdes (en plus de l'aldostérone) est nécessaire au transport de l'ion sodium vers le milieu interstitiel. En outre, à la suite de leur expérimentation sur la vessie de Crapaud, HANDLER et coll. (1969) supposent que les glucocorticoïdes influenceraient la réponse du rein à l'ADH. Mais aucune étude concernant l'influence des hormones surrénaliennes sur les activités enzymatiques rénales intervenant dans le mécanisme d'action de l'ADH n'a jusqu'à présent été effectuée.

En revanche, BRAUN et HECHTER (1970) démontrent que les glucocorticoïdes modifient l'activation de l'adényl-cyclase par la corticotrophine dans les cellules adipeuses. En effet, la surrénalectomie et l'hypophysectomie réduisent la stimulation de l'adényl-cyclase sensible à l'ACTH, alors que les systèmes adényl-cyclasiques activés par le glucagon, l'adrénaline et le fluorure de sodium ne sont pas concernés. Un traitement à la dexaméthasone des animaux surrénalectomisés rétablit la sensibilité à l'hormone hypophysaire. Les auteurs suggèrent que la dexaméthasone induit la biosynthèse d'un composé nécessaire à l'activation de l'adényl-cyclase par la corticotrophine. Ils ne précisent cependant pas à quel niveau intervient ce composé dans l'activation de l'enzyme.

On est donc en mesure de se demander :

α - si la surrénalectomie ne modifie pas les activités adényl-cyclasiques rénales, en particulier celles stimulées par l'hormone antidiurétique.

β - à quel type de corticoïdes il est possible d'attribuer les changements observés

γ - et si les modifications constatées sont la conséquence d'une variation du nombre de récepteurs ou d'une synthèse protéique intervenant au niveau du couplage récepteur/adényl-cyclase.

B - Effets de la surrénalectomie sur l'activité de l'adényl-cyclase rénale stimulée par la vasopressine

Il s'agit de comparer les stimulations par l'hormone antidiurétique d'adényl-cyclases provenant de deux préparations membranaires différentes : l'une effectuée à partir de reins de rats témoins et l'autre à partir de reins de rats surrénalectomisés. Ce problème est délicat ; car, au cours de la préparation de l'extrait enzymatique, les structures impliquées dans l'activation de l'adényl-cyclase par la vasopressine sont altérées. En effet, les concentrations d'ADH nécessaires pour stimuler l'enzyme dans de tels systèmes acellulaires sont supérieures à la concentration de l'hormone dans le plasma de Rat. Aussi, pour nous assurer que les modifications observées ne sont pas secondaires aux altérations de membranes susceptibles de varier d'une préparation à l'autre, nous avons comparé, à chaque expérience, non seulement l'activation par l'ADH de l'adényl-cyclase des extraits rénaux de rats surrénalectomisés à celle obtenue avec les préparations de rein de rats témoins, mais nous avons encore confronté, entre chaque extrait, les activités de base de l'adényl-cyclase, ainsi que sa stimulation par le fluorure de sodium (NaF) et la parathormone (PTH). C'est ainsi qu'au cours de six expériences différentes (tableau XVIII) nous avons mesuré simultanément, à partir d'extraits de medulla rénale de rats normaux et de rats surrénalectomisés depuis huit jours, l'activation de l'adényl-cyclase par des concentrations croissantes de lysine-vasopressine, ainsi que sa stimulation par la PTH à 30 U/ml et le fluorure de sodium à 10^{-2} M. On constate alors que la surrénalectomie entraîne une diminution de 30 p. cent de l'activation maximale de l'enzyme par la vasopressine, alors que l'activité de base de l'adényl-cyclase ainsi que sa stimulation par la parathormone et le fluorure de sodium ne semblent pas affectées.

La figure (18) représente les variations de la réponse à la vasopressine de l'adényl-cyclase médullaire rénale d'animaux témoins et surrénalectomisés. Outre la réduction de l'activation maximale de l'enzyme, on ne remarque aucune modification sensible de l'affinité apparente pour l'hormone, le Km apparent étant de $3,7\ 10^{-8}$ M pour les animaux témoins, et de $3,6\ 10^{-8}$ M pour les rats surrénalectomisés.

TABLEAU XVIII

Effets de la surrénalectomie sur les activités adényl-cyclasiques de la medulla de rein de Rat

Exp N°	Activité de base			Lysine-vasopressine 10^{-5}M			PTH 30 U/ml			NaF 10^{-2}M		
	T	S^{--}	$\frac{S^{--}}{T}$	T	S^{--}	$\frac{S^{--}}{T}$	T	S^{--}	$\frac{S^{--}}{T}$	T	S^{--}	$\frac{S^{--}}{T}$
1	145	133	0,92	1120	737	0,66	443	417	0,94	1758	1719	0,98
2	161	135	0,84	825	492	0,60	485	407	0,84	1076	768	0,71
3	250	275	1,10	2600	1840	0,71	839	932	1,11	2340	2357	1,00
4	378	366	0,97	3700	2680	0,72	1189	1099	0,92	2166	1894	0,88
5	92	100	1,09	537	397	0,74	258	267	1,03	404	406	1,00
6	95	96	1,01	547	422	0,78	224	271	1,21	383	411	1,07
M ± sm			0,99 ± 0,10			0,70 ± 0,06			1,01 ± 0,14			0,94 ± 0,13

Dans une série de six expérimentations, les effets de la surrénalectomie sur les activités de base et celles stimulées par la vasopressine à 10^{-} M, la PTH à 30 U/ml et le NaF à 10^{-} M sont comparés.

Les activités enzymatiques sont exprimées en pMoles de 3'-5' AMP cyclique formées/10 mn/mg de protéine (cf. premier chapitre de "Méthodologie"), chaque valeur étant la moyenne de deux déterminations :

M ± sm = moyenne ± erreur standard

T = animaux témoins

S^{--} = animaux surrénalectomisés

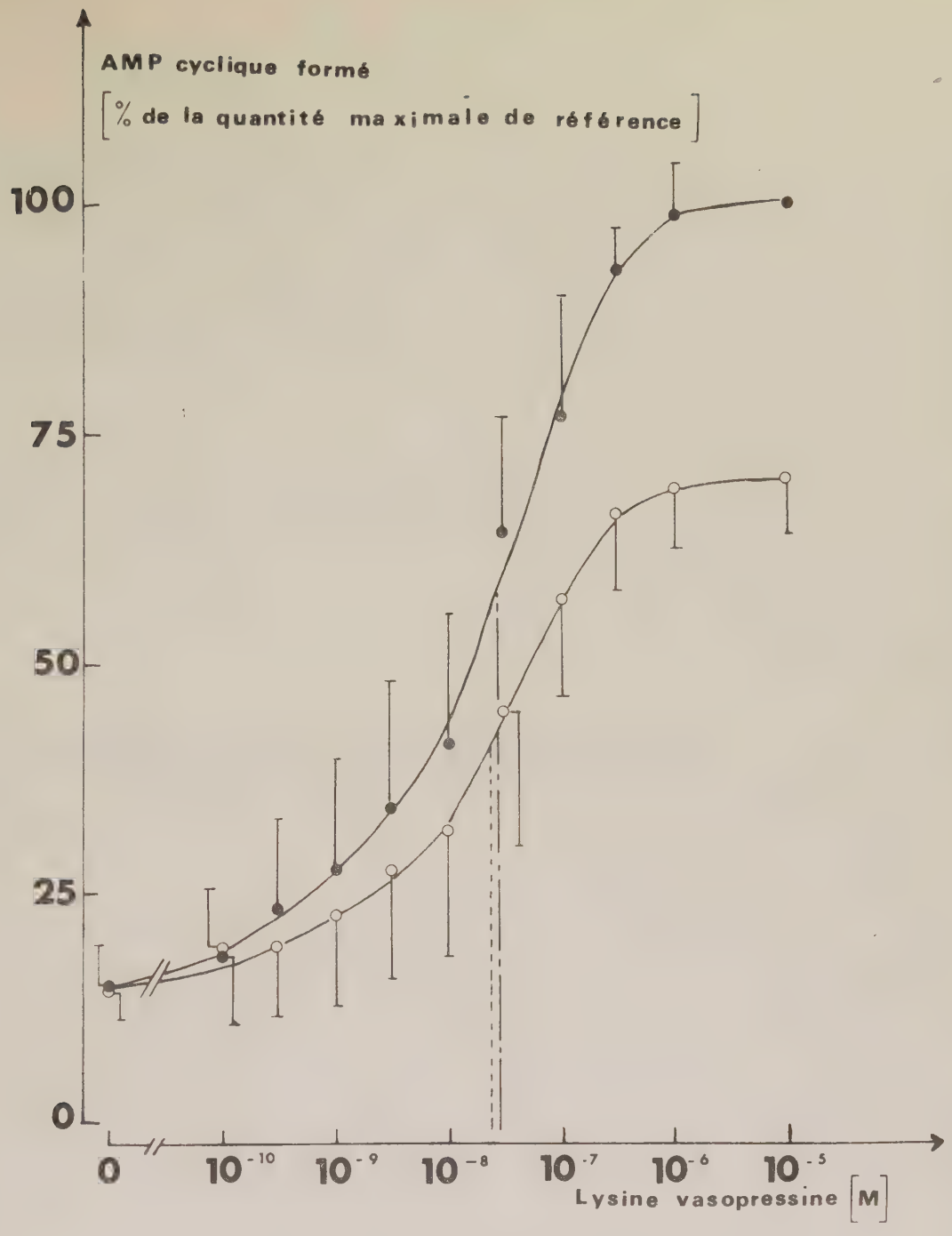


FIGURE 18 — *Activation par la vasopressine de l'adényl-cyclase de la medulla de rein de Rats normaux ●——● et surrénalectomisés ○——○*

Les animaux surrénalectomisés reçoivent une solution isotonique de chlorure de sodium en guise de boisson.

La quantité d'AMP cyclique formée est exprimée en pourcentage de la quantité maximale obtenue avec des préparation membranaires de reins de rats témoins. Chaque valeur moyenne est accompagnée de son erreur standard (n = 6). Les Km apparents d'activation ($3,7.10^{-8}$ M et $3,6.10^{-8}$ M) sont indiqués par les lignes pointillées.

Les effets de la surrénalectomie apparaissent progressivement avec le temps : une légère diminution de l'activité enzymatique est visible 34 heures après l'opération, et elle atteint son maximum 8 jours après la surrénalectomie (figure 19). Au cours de ces différentes expériences, ni l'activité enzymatique de base ni celles stimulées par la parathormone ou le fluorure de sodium n'ont varié.

Au cours de quelques expérimentations, nous avons aussi évalué simultanément la réponse à la lysine-vasopressine de l'adényl-cyclase des zones corticales rénales. Comme pour la médulla, l'activité de base de l'enzyme reste inchangée après surrénalectomie, et la réponse maximale à la vaso pressine diminue 5 jours après l'opération (tableau IX).

TABLEAU XIX — *Effet de la surrénalectomie sur les activités adényl-cyclasiques du cortex de rein de Rat*

Temps après l'opération	Activité de base			Lysine - vasopressine 10^{-5} M		
	T	S^{--}	$\frac{S^{--}}{T}$	T	S^{--}	$\frac{S^{--}}{T}$
34 heures	134	126	0,94	479	440	0,92
5 jours	97	92	0,95	395	238	0,60

Les activités sont exprimées en pMoles d'AMP cyclique formées/10 mn/mg de protéine (T = rats témoins, S^{--} = rats surrénalectomisés)

L'absence de surrénales modifie donc la réponse à l'ADH du système adényl-cyclasique rénal. Pour savoir à quel corticoïde il est possible d'attribuer ce changement, nous avons alors étudié l'action de l'aldostérone et de la dexaméthasone sur l'activité de cette enzyme.

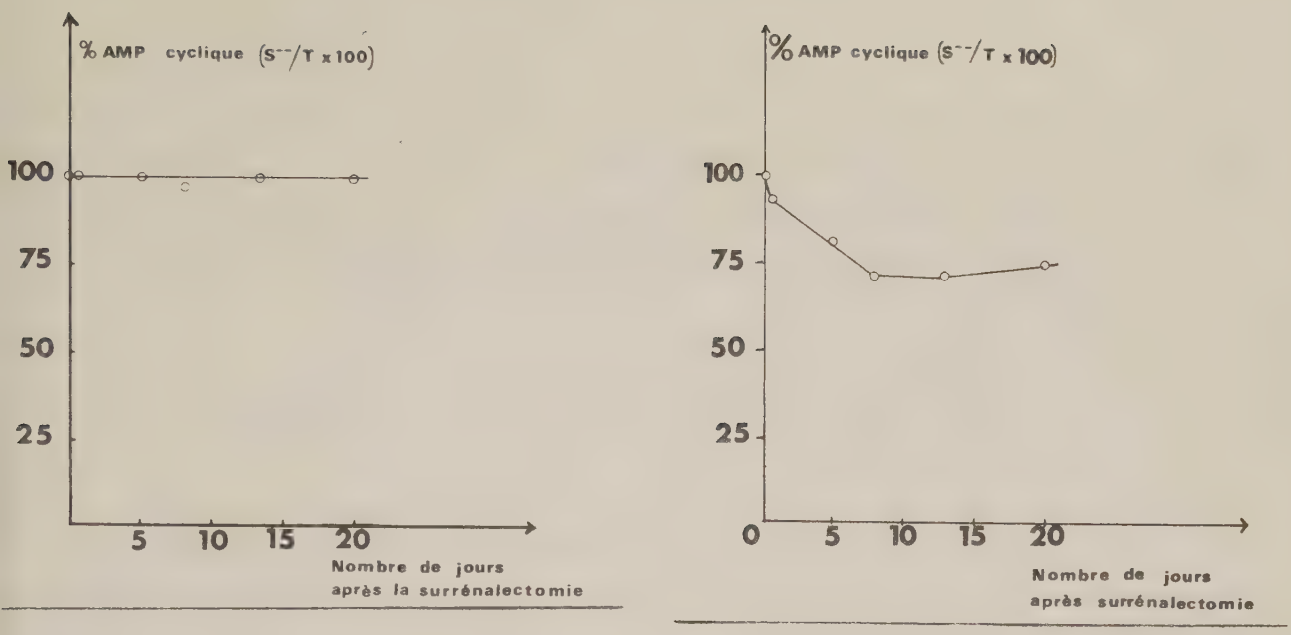


FIGURE 19 — *Variations de l'activité de l'adényl-cyclase de base et de sa stimulation par la vasopressine au cours des jours qui suivent la surrénalectomie*

Vingt animaux provenant du même groupe étaient employés ; dix étaient surrénalectomisés et recevaient une solution isotonique de chlorure de sodium en guise de boissons. Les animaux surrénalectomisés étaient sacrifiés 34 heures, 5, 8, 13 et 19 jours après la surrénalectomie (deux animaux pour chaque durée d'observation) en même temps que deux témoins qui avaient subi une opération simulée. Les activités adényl-cyclasiques étaient mesurées en absence (courbe de gauche) et en présence de lysine-vasopressine à 10^{-5} M (courbe de droite).

Les activités enzymatiques évaluées dans les extraits membranaires rénaux provenant d'animaux surrénalectomisés étaient exprimés en pourcentage de l'activité obtenue avec les extraits provenant d'animaux contrôles.

C - Effets des corticoïdes sur l'activité de l'adényl-cyclase rénale sensible à l'hormone antidiurétique

Cette étude nous a conduit d'une part à rechercher si un traitement à l'aldostérone ou à la dexaméthasone corrigeait les perturbations engendrées par la surrénalectomie et d'autre part si les corticoïdes intervenaient "in vitro" au niveau de la réaction enzymatique.

1 - Action de l'aldostérone

Cinq jours après la surrénalectomie, on administre à chaque rat, durant 3 jours des injections intramusculaires, biquotidiennes de 12,5 µg d'aldostérone/100 g de poids corporel. La septième et dernière injection a lieu deux heures avant le sacrifice.

Les activités adényl-cyclasiques des animaux surrénalectomisés traités sont comparées à celles d'animaux privés de surrénales mais ne recevant pas de traitement hormonal.

L'aldostérone accroît l'activation maximale de l'adényl-cyclase que la surrénalectomie avait fait chuter. La figure (20) montre un accroissement de 33 p. cent de la réponse maximale, valeur comparable à la baisse d'activité moyenne obtenue après surrénalectomie. Dans quelques expérimentations, l'effet de l'aldostérone est plus discret et ne compense pas toujours la réduction d'activation observée après l'opération.

2 - Action de la dexaméthasone

En suivant un protocole expérimental identique à celui utilisé pour l'aldostérone (injections biquotidiennes durant trois jours de 100 µg de dexaméthasone/100 g de poids corporel, à partir du 5ème jour après la surrénalectomie), on constate que la dexaméthasone agit plus intensément que l'al-

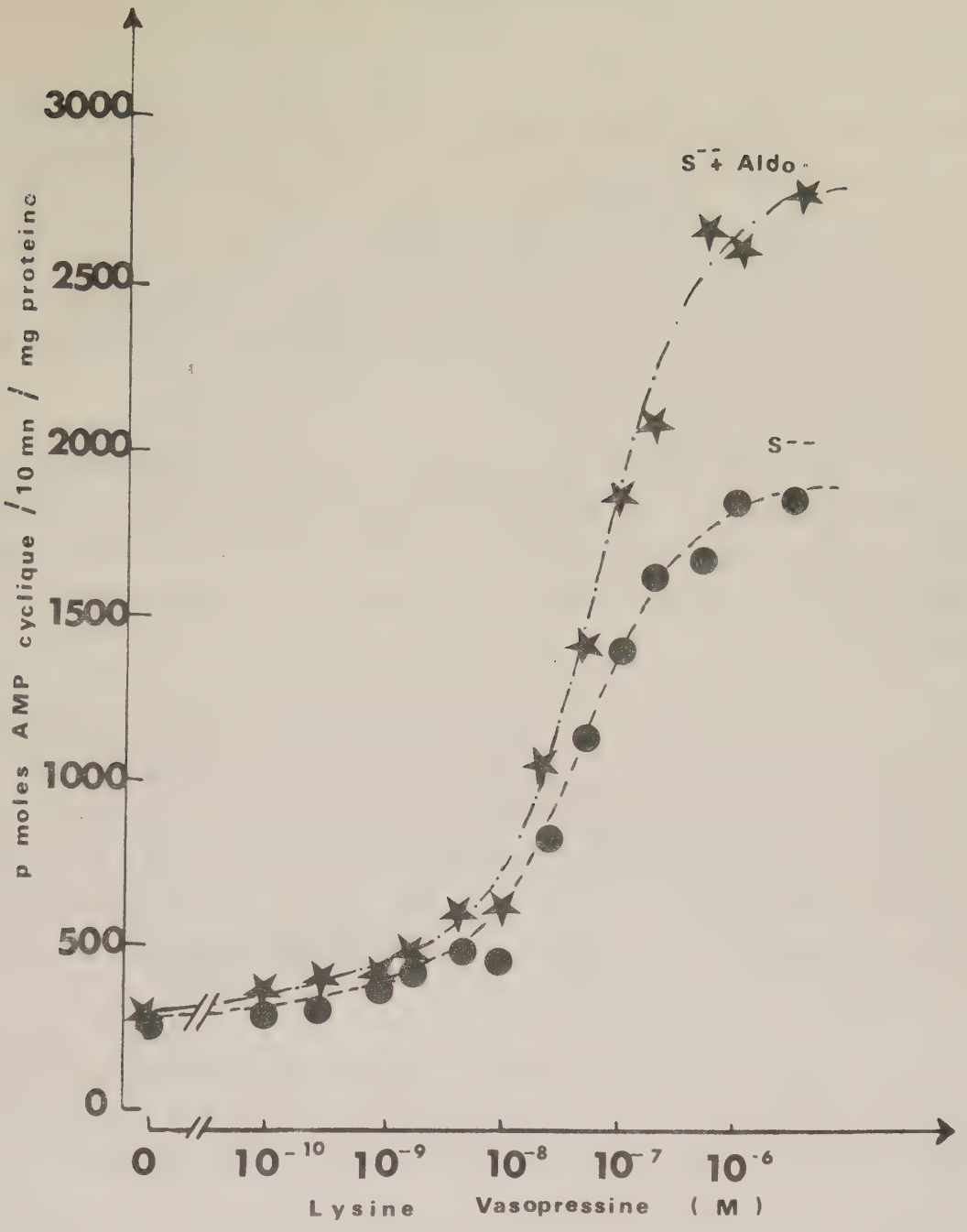


FIGURE 20 — *Effet de l'aldostérone sur l'activité adényl-cyclasique vasopressine dépendante du Rat surrénalectomisé*

Les mesures ont été effectuées à partir d'extraits membranaires de medulla rénales, provenant de deux groupes d'animaux surrénalectomisés depuis huit jours, auxquels on donnait comme seule boisson une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. cent. Les rats d'un des groupes recevaient 7 injections intramusculaires d'aldostérone (12,5 µg/100 g de poids corporel), 74, 64, 50, 40, 26, 16 et 2 heures avant le sacrifice.

Chaque mesure est la moyenne de deux déterminations indépendantes.

dostérone sur l'activation de l'adényl-cyclase par la vasopressine. L'augmentation de la stimulation maximale de l'enzyme par le peptide neurohypophysaire est d'environ 100 p. cent, dépassant largement le maximum obtenu avec les extraits témoins (figure 21). La figure (21) montre en outre que les effets de l'aldostérone et de la dexaméthasone ne sont pas additifs ; de plus, quel que soit le traitement, l'activité de base reste inchangée et l'affinité apparente pour l'hormone semble peu modifiée.

Une seule injection de 0,2 mg de dexaméthasone, 2 heures avant le sacrifice, à des rats privés de surrénales depuis sept jours, n'influencé pas la réponse de l'adényl-cyclase à la vasopressine ; elle reste comparable à celles des rats surrénalectomisés ne recevant aucun traitement hormonal (figure 22).

L'effet de la dexaméthasone a aussi été recherché chez des rats non surrénalectomisés auxquels on a administré, par voie intramusculaire, deux fois par jour durant 3 jours, 0,2 mg du glucocorticoïde considéré. Dans ce cas, la stimulation maximale de l'adényl-cyclase par l'hormone antidiurétique est fortement amplifiée, si on la compare à celle d'animaux témoins qui reçoivent des injections d'un soluté chloruré sodique isotonique de même volume (figure 23).

En outre, un traitement à la corticostérone (injections de 0,8 mg administrées par voie intramusculaire deux fois par jour durant 8 jours) n'est pas capable de corriger la diminution de la réponse maximale à l'ADH engendrée par la surrénalectomie.

3 - EFFETS DES CORTICOÏDES SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DANS LES CONDITIONS D'EXPÉRIMENTATIONS "IN VITRO"

Nous avons cherché à savoir si les corticoïdes intervenaient directement au niveau de la réaction enzymatique. Ajoutées "in vitro" dans le milieu réactif, l'aldostérone comme la dexaméthasone, à des concentrations de 10^{-8} M à 10^{-5} M, n'altèrent ni l'activité de base de l'enzyme, ni la réponse de l'adényl-cyclase à l'hormone antidiurétique (tableau 20). De telles

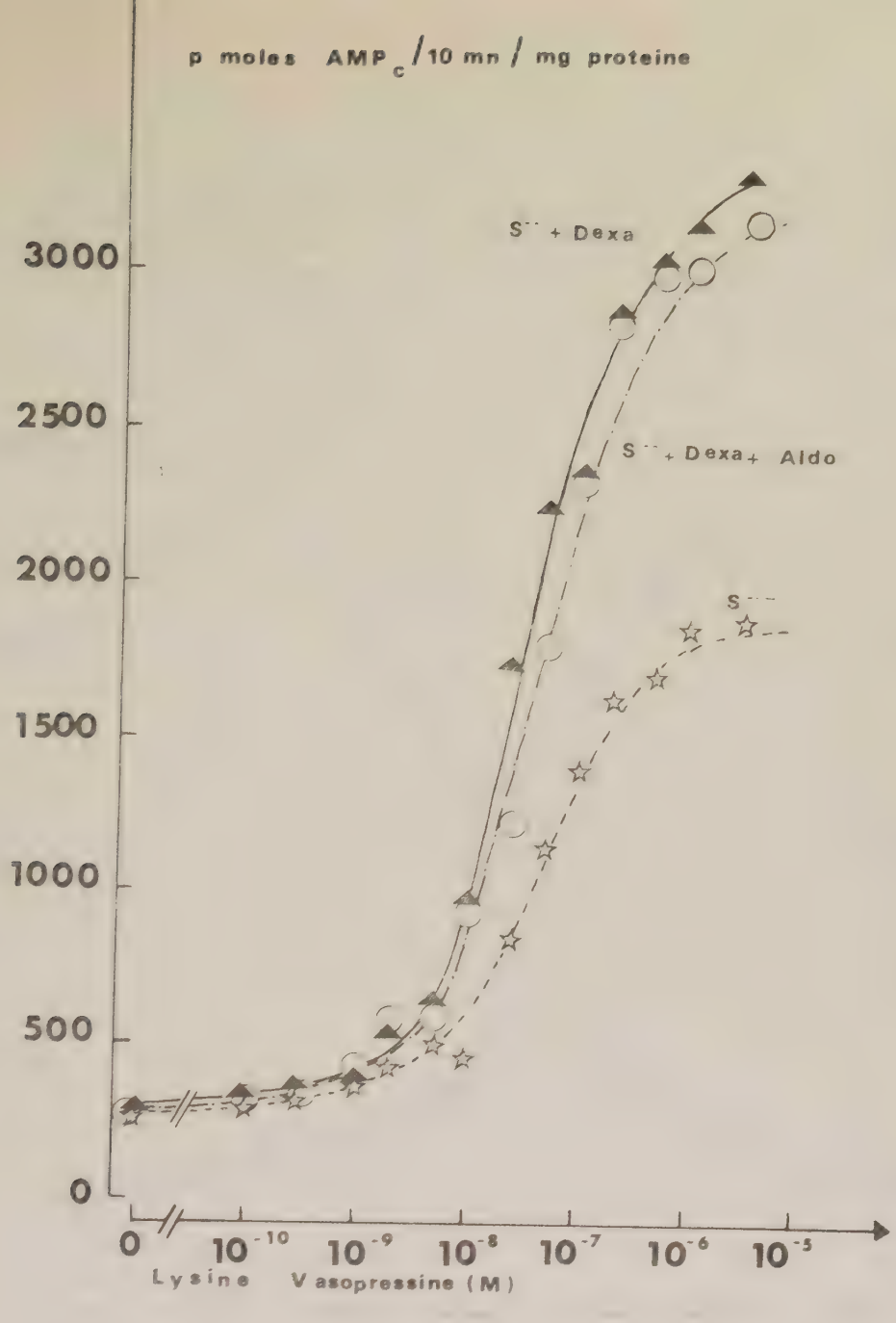


FIGURE 21 — *Effet d'un traitement à la dexaméthasone et d'un traitement conjugué : dexaméthasone et aldostérone sur la stimulation par la vasopressine de l'adényl-cyclase de medulla de rein de rats surrénalectomisés*

Cinq jours après l'opération, les animaux surrénalectomisés ont été divisés en trois groupes. Les animaux du premier groupe (S⁻⁻ + Dexa) recevaient deux fois par jour des injections intramusculaires de 0,2 mg de dexaméthasone (▲). Aux rats du second groupe, on administrait simultanément 0,2 mg de dexaméthasone et 25 µg d'aldostérone (O). Quant aux animaux surrénaloprives du troisième groupe, ils recevaient en intramusculaire une solution placebo de chlorure de sodium à 0,9 p. cent (0,2 ml). Tous les animaux étaient sacrifiés après trois jours de traitement, deux heures après la 7ème injection.

Chaque mesure est la moyenne de deux déterminations expérimentales indépendantes.

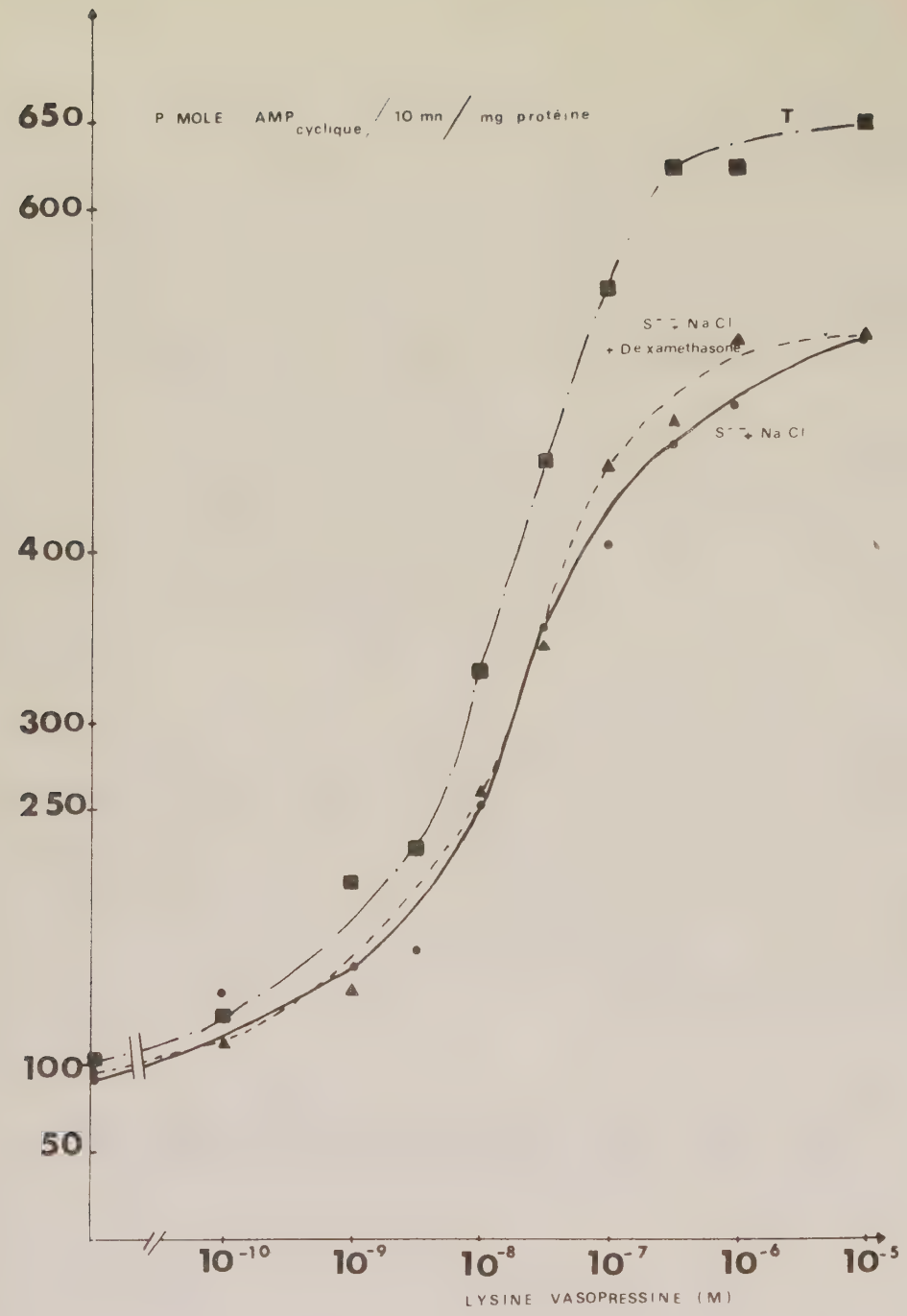


FIGURE 22- *Manque d'action d'une seule injection de dexaméthasone effectuée 2 heures avant le sacrifice*

Les extraits membranaires proviennent d'animaux surrénalectomisés depuis 8 jours (●), d'animaux surrénalectomisés ayant reçu une seule injection de dexaméthasone deux heures avant leur sacrifice (▲) et de rats témoins (■).

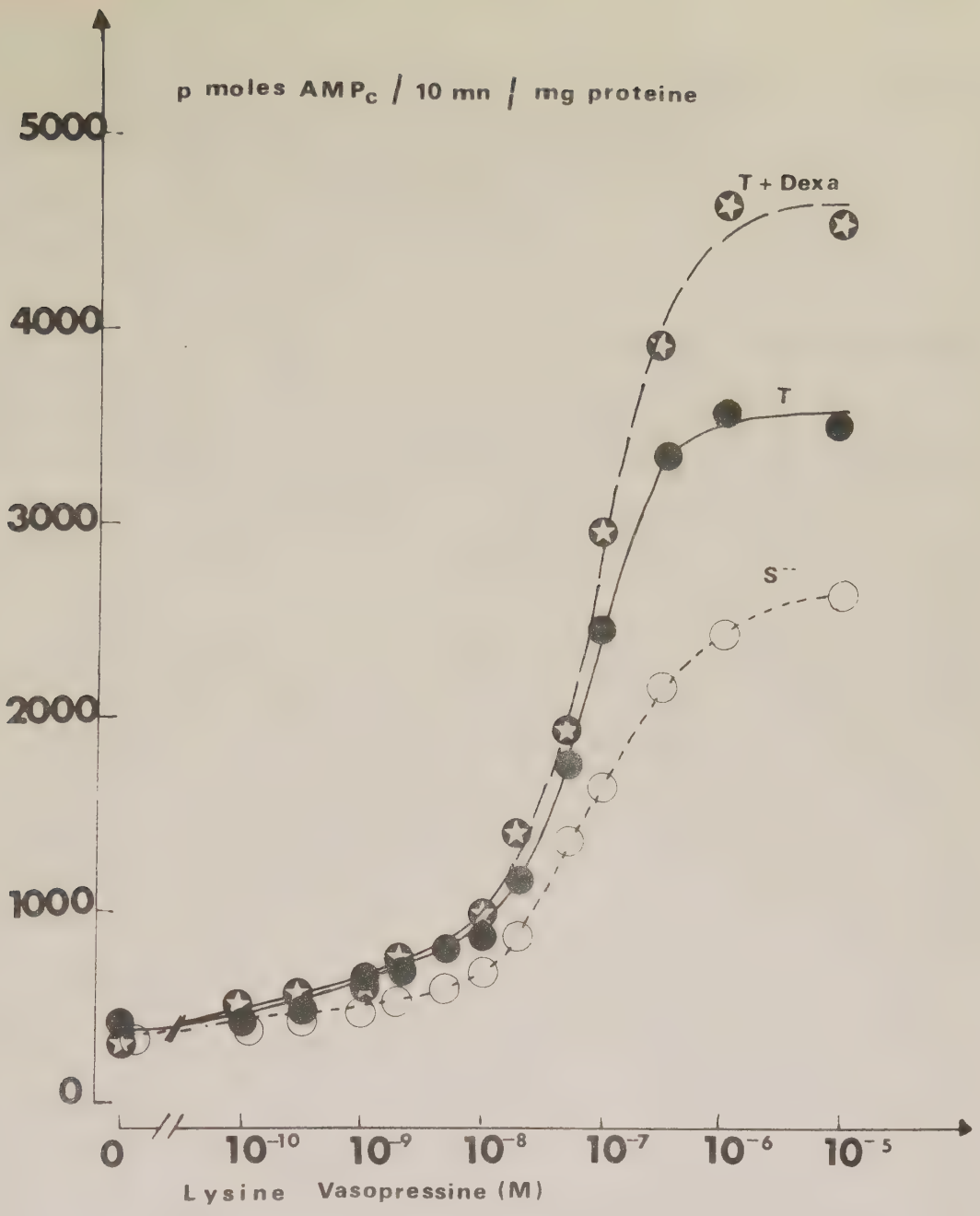


FIGURE 23 — *Effet de la dexaméthasone sur la stimulation par l'hormone antidiurétique, de l'adényl-cyclase de medulla de rein de Rats non surrénalectomisés*

Le traitement à la dexaméthasone administré à ces animaux (✪) était identique à celui donné aux rats surrénalectomisés (cf. légende de la figure 18).

T = rats témoins (●)

S⁻⁻ = rats surrénalectomisés (○)

TABLEAU XX

Effets de l'aldostérone et de la dexaméthasone sur l'activité de l'adényl-cyclase de rein de Rat dans les conditions d'expériences "in vitro"

Corticoïdes	Activités adényl-cyclasiques pM/10 mn/mg de protéine	
	Activité de base	Stimulation par la vasopressine 10^{-6} M
Aldostérone (M)		
0	92	509
10^{-8}	94	493
10^{-7}	93	484
10^{-6}	87	474
10^{-5}	91	492
Dexaméthasone		
0	92	509
10^{-8}	92	487
10^{-7}	91	488
10^{-6}	95	492
10^{-5}	96	482

Les activités adényl-cyclasiques ont été mesurées dans les fractions membranaires préparées à partir de medulla rénales de rats surrénalectomisés depuis 8 jours.

Les activités enzymatiques sont exprimées en pMoles d'AMP cyclique formées/mg de protéine/10 mn.

constatations semblent donner crédit au modèle général proposé pour décrire le mécanisme d'action cellulaire des hormones corticosurrénaliennes : l'aldostérone et la dexaméthasone moduleraient la réponse de l'adényl-cyclase à la vasopressine en contrôlant une biosynthèse protéique. Ce contrôle pourrait s'exercer à des étapes différentes de l'activation de l'adényl-cyclase. Il pourrait en effet régler la capacité de fixation de l'ADH au niveau du rein, et les modifications observées en seraient la conséquence ; ou encore agir à l'étape ultérieure qui relie l'occupation des récepteurs rénaux de l'hormone à l'activation de l'adényl-cyclase.

D - LES CORTICOÏDES SONT CAPABLES D'AUGMENTER LE NOMBRE DE RÉCEPTEURS RÉNAUX LIANT SPÉCIFIQUEMENT L'HORMONE ANTIDIURÉTIQUE. CES MODIFICATIONS EXPLIQUENT-ELLES À ELLES SEULES LEUR INFLUENCE SUR LA STIMULATION DE L'ADÉNYL-CYCLASE PAR L'ADH ?

La mesure de fixation de ^{3}H-LVP est évaluée selon la technique décrite dans le chapitre "Méthodologie" ; la fixation totale et la fixation non spécifique sont déterminées pour des concentrations croissantes d'hormone allant de 10^{-10} à 5.10^{-8} M. Au delà de cette concentration, la valeur de la fixation non spécifique devient très importante, comparée à celle de la fixation totale, et on ne peut alors déterminer avec précision la quantité d'hormone tritiée fixée spécifiquement aux récepteurs.

Pour préciser si les modifications de la réponse de l'adényl-cyclase à la vasopressine sont liées ou non aux variations de la capacité de fixation de l'hormone, on effectue simultanément et sur les même préparations membranaires les mesures de la liaison de la lysine-vasopressine tritiée et celles de l'activation de l'adényl-cyclase.

D'autre part, il nous est apparu nécessaire de vérifier auparavant si des quantités variables d'hormone endogène ne restaient pas fixées aux récepteurs rénaux, durant la préparation des extraits membranaires. En

effet, en interférant avec la lysine-vasopressine tritiée au cours des mesures de fixation, elles rendraient impossible toute comparaison.

Une expérience a été alors entreprise dans le but de saturer tous les récepteurs rénaux spécifiques de l'hormone antidiurétique avec de la lysine-vasopressine tritiée, et d'estimer la quantité d'hormone restée fixée aux membranes dans l'extrait final.

Pour cela, on perfuse chez un rat anesthésié une solution d'hormone tritiée à une concentration de 26 pMoles/ml. Le débit de perfusion est choisi de manière à maintenir constante la concentration plasmatique du peptide tritié à une concentration de 100 µU/ml (soit 0,38 pM/ml). Si l'on considère que chez le Rat, la clearance totale de l'hormone s'élève à 3,4 ml/mn/100 g (GINSBURG, 1957), il s'avère nécessaire de perfuser l'animal avec un débit de 1,3 pMoles d'hormone/mn/100 g (100 µl/mn).

La perfusion se poursuit pendant une période de 20 minutes ; on prélève alors immédiatement les reins, puis on prépare les membranes plasmiques selon les techniques habituelles et l'on mesure la radioactivité.

La quantité maximale de vasopressine marquée, retrouvée fixée aux membranes, correspondait à $0,6 \pm 1,3.10^{-15}$ M/mg de protéine, soit moins de 0,1 p. cent de la capacité maximale de fixation de l'hormone sur ces membranes.

1 - EFFETS DE LA SURRÉNALECTOMIE SUR LA LIAISON ^{3}H-LVP-RÉCEPTEURS

La figure (24) montre que la surrénalectomie ne modifie pas de manière évidente la capacité de fixation de l'hormone sur les membranes, alors que, comme nous l'avons remarqué précédemment, l'activation de l'adénylcyclase est réduite.

Dans quelques expériences seulement, le nombre de moles de ^{3}H-LVP fixées par milligramme de protéine est légérement plus faible lorsqu'on effectue les mesures avec les extraits membranaires de medulla de rein de rats

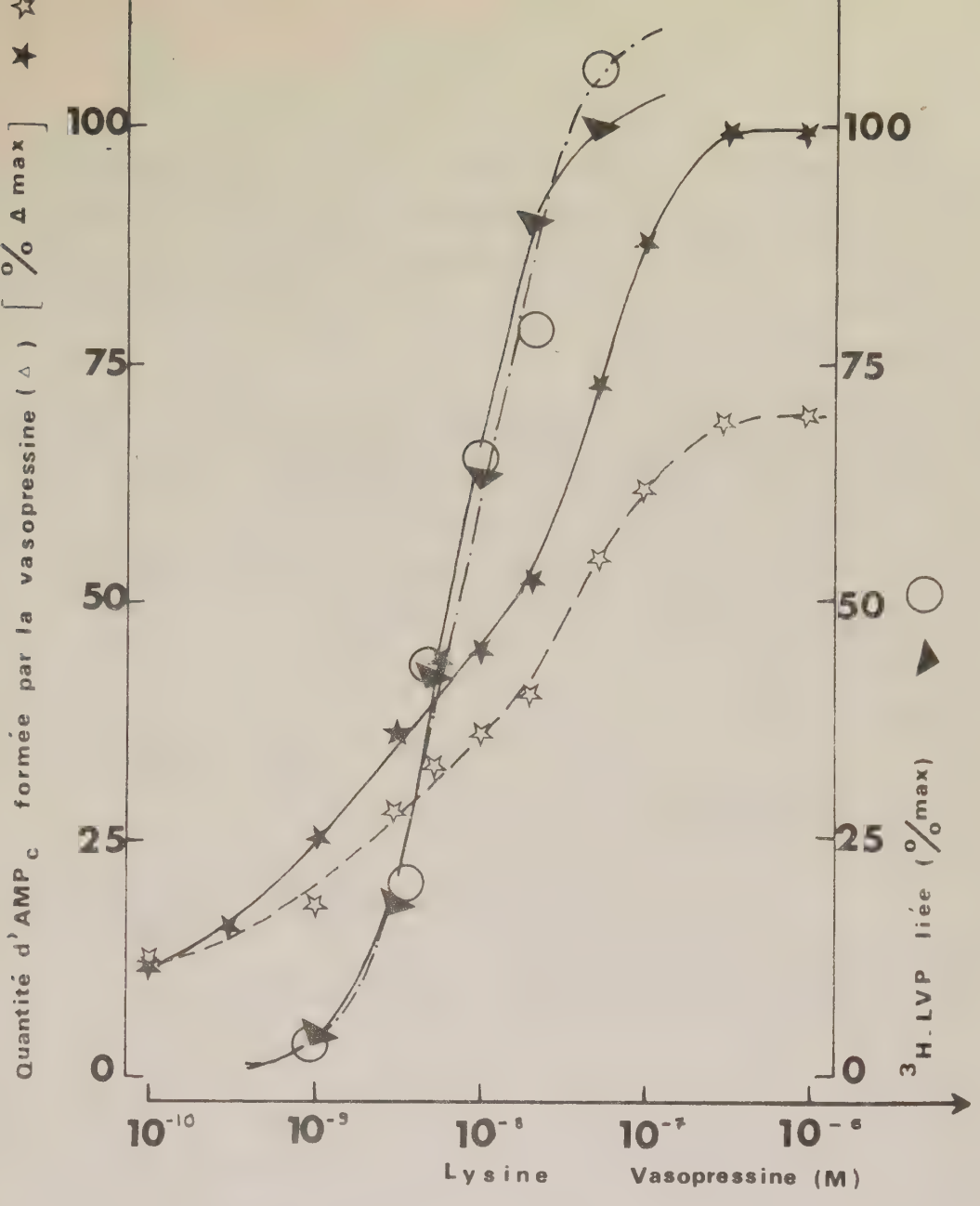


FIGURE 24 *Effets comparés de la surrénalectomie sur la capacité de fixation de la vasopressine et sur l'efficacité de l'hormone à stimuler l'adényl-cyclase*

Les extraits membranaires ont été préparés à partir de médullaires de reins de rats témoins (★, ○) et de rats surrénalectomisés depuis 8 jours (☆, ▲).

La stimulation de l'adényl-cyclase (★, ☆) par la lysine-vasopressine est exprimée en pourcentage de l'activité maximale de la préparation contrôle provenant de médullaires rénales de rats témoins. Au cours de cette expérience, cette activité maximale (en présence de 10^{-6} M de lysine-vasopressine) est de 582 pMoles d'AMP cyclique/10 mn/mg de protéine, tandis que l'activité de base correspond à 93 pMoles d'AMP cyclique/10 mn/10 mg de protéine.

La capacité de fixation de la lysine-vasopressine tritiée (○, ▲) est exprimée en pourcentage de la capacité maximale de fixation de l'hormone sur les extraits membranaires rénaux de rats témoins, en présence de 5.10^{-8} M de ^{3}H-LVP ; la valeur trouvée au cours de cette expérimentation est de 0,17 pMoles/mg de protéine.

surrénalectomisés. Cependant, cette diminution est toujours inférieure à la réduction de l'activation de l'adényl-cyclase ; on a pu calculer à partir de 18 valeurs appariées que le pourcentage de diminution de l'activité de l'adényl-cyclase dépasse de 16 ± 5 p. cent ($p < 0,01$) celui de la réduction de la quantité d'hormone fixée.

Ces résultats suggèrent que la perturbation engendrée par la surrénalectomie dans la réponse de l'adényl-cyclase à la vasopressine ne dépend pas principalement du nombre de récepteurs rénaux, mais qu'elle serait plutôt la conséquence d'une défaillance dans la régulation de l'étape suivante qui conduit à l'activation de l'adényl-cyclase.

2 - ACTION DES CORTICOÏDES SUR LA CAPACITÉ DE LIAISON DE LA VASOPRESSINE AU NIVEAU DU REIN

INTERVENTION DE LA DEXAMÉTHASONE DANS L'EFFICACITÉ DU COUPLAGE RÉCEPTEUR/ADÉNYL-CYCLASE

Les rats privés de surrénales depuis 5 jours sont soumis à un traitement à l'aldostérone ou bien à la dexaméthasone identique à celui précédemment décrit : administration à intervalles réguliers (74, 64, 50, 40, 26, 10 et 2 heures avant le sacrifice) de 12,5 µg d'aldostérone ou 100 µg de dexaméthasone par 100 g de poids corporel. Ils sont comparés à des animaux surrénalectomisés qui ne reçoivent aucune compensation hormonale, mais auxquels on injecte un volume identique d'une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. cent.

Les variations de la capacité de fixation de l'hormone et celles de l'activation de l'adényl-cyclase par la vasopressine mesurée sur les mêmes préparations membranaires sont confrontées entre elles pour chaque concentration hormonale.

a) EFFETS DE L'ALDOSTERONE

Le tableau (XXI) montre que l'aldostérone augmente légèrement la

TABLEAU XXI — *Effets de l'aldostérone sur la capacité de fixation de la lysine-vasopressine tritiée et sur l'activité adényl-cyclasique vasopressine dépendante*

LVP {M}	Augmentation de la liaison de ^{3}H-LVP (%) A	Augmentation de l'activation de l'adényl-cyclase (%) B
$1 . 10^{-9}$	13	7
$3 . 10^{-9}$	20	48
$5 . 10^{-9}$	25	37
$1 . 10^{-8}$	22	5
$2 . 10^{-8}$	23	29
$5 . 10^{-8}$	18	35
m ± sm	20 ± 4	27 ± 7
B - A	7 ± 16 (n. s.)	

Pour chaque concentration, on calcule l'augmentation de la liaison ^{3}H-LVP et de l'activation de l'adényl-cyclase consécutive au traitement à l'aldostérone d'animaux surrénalectomisés. Elle s'exprime en pourcentage des valeurs obtenues avec les extraits de rats témoins surrénalectomisés.

m ± sm = moyenne ± erreur standard.

Ces valeurs sont significativement différentes de 0 ; la première (20 ± 4) pour un seuil de sécurité de 99 p. cent, la seconde (27 ± 7) pour un seuil de 95 p. cent.

n.s. = non significatif

TABLEAU XXII — *Effet de la dexaméthasone sur la capacité de fixation de ^{3}H-LVP et sur l'activation de l'adényl-cyclase*

LVP M	Dexaméthasone		Dexamethasone + aldostérone	
	Augmentation de la liaison ^{3}H-LVP (%) A	Augmentation de l'activation de l'adényl-cyclase (%) B	Augmentation de la liaison ^{3}H-LVP (%) A	Augmentation de l'activation de l'adényl-cyclase (%) B
1.10^{-9}	19	15	- 9	67
3.10^{-9}	14	80	5	50
5.10^{-9}	30	65	12	55
1.10^{-8}	23	110	11	98
2.10^{-8}	28	163	28	76
5.10^{-8}	4	125	91	77
m ± sm	20 ± 10^{xx}	93 ± 51^{x}	23 ± 35 (n.s)	70 ± 17^{xx}
B - A	73 ± 52^{x}		49 ± 37^{x}	

Les animaux surrénalectomisés, traités à la déxaméthasone, sont comparés aux animaux surrénalectomisés ne recevant pas de corticoïdes. Pour chaque concentrations hormonale, les variations de la liaison de la vasopressine et celles de l'activation par l'adényl-cyclase mesurées chez les rats soumis aux différents traitements (déxaméthasone et déxaméthasone + aldostérone) sont exprimées en pourcentage de la caleur "témoin" correspondante.

m ± sm = moyenne ± erreur standard

x = valeurs significativement différentes de 0 ($p < 0,01$)

capacité de fixation de la lysine-vasopressine tritiée, ainsi que la stimulation de l'adényl-cyclase par la vasopressine. La confrontation des augmentations relatives des deux grandeurs suggère que l'aldostérone exerce principalement son activité en augmentant le nombre de récepteurs rénaux spécifiques de l'hormone antidiurétique.

b) EFFETS DE LA DEXAMETHASONE

La déxaméthasone augmente dans les mêmes proportions que l'aldostérone la capacité de fixation de la lysine-vasopressine tritiée. Outre sa possibilité d'accroître le nombre de récepteurs rénaux, le glucocorticoïde affecte plus intensément l'étape suivante, en augmentant l'efficacité du couplage récepteur/adényl-cyclase (tableau XXII).

Ce tableau indique aussi que les effets de l'aldostérone et de la dexaméthasone ne sont pas additifs.

Chez les rats témoins non surrénalectomisés, un traitement identique à la dexaméthasone ne modifie pas la capacité de liaison de l'hromone antidiurétique sur les fractions membranaires. L'augmentation de l'activation maximale ne peut donc s'expliquer que par une intensification du processus de couplage menant à la stimulation de l'enzyme.

E - DISCUSSION

Au cours de ce chapitre nous avons clairement démontré que la surrénalectomie diminue l'activation maximale de l'adényl-cyclase par la vasopressine, sans changement de l'affinité apparente pour l'hormone. L'absence de corticoïdes semble affecter principalement le système adényl-cyclasique sensible à l'hormone antidiurétique ; en effet, l'activité de base de l'enzyme et sa stimulation par le fluorure de sodium et la parathormone ne sont pas modifiées dans ces circonstances. Dans quelques expériences, la capacité maximale de fixation de l'hormone est réduite après surrénalectomie ; toutefois cette diminution reste toujours inférieure à la réduction de la stimulation de l'adényl-cyclase par la vasopressine. L'absence de surrénales est

donc susceptible de provoquer simultanément :

- une diminution des récepteurs rénaux spécifiques de l'ADH ;
- une réduction de l'efficacité du couplage récepteur/adényl-cyclase.

Un traitement à l'aldostérone des animaux surrénalectomisés accroît la capacité de liaison de la lysine-vasopressine tritiée aux membranes, et l'action de l'aldostérone observée chez les animaux surrénalectomisés au niveau du système adényl-cyclasique rénal sensible à l'hormone antidiurétique peut s'expliquer simplement par l'augmentation du nombre de récepteurs rénaux spécifiques de l'hormone. En effet, comme le montre le tableau (XXI), l'augmentation de la fixation de ^{3}H-LVP (exprimée en pourcentage par rapport à la fixation obtenue avec les extraits provenant d'animaux surrénalectomisés qui ne reçoivent pas de traitement) n'est pas statistiquement différente de l'accroissement de l'activation de l'adényl-cyclase observée dans les mêmes conditions. Si nos expériences montrent que l'aldostérone est capable de modifier la stimulation du système adényl-cyclasique par la vasopressine, il n'a pas été possible à LANG et EDELMAN (1972) de mettre en évidence une influence quelconque de ce stéroïde au niveau de cette activité enzymatique. Ceci provient probablement des conditions expérimentales employées par les auteurs ; en particulier les concentrations de vasopressine utilisées pour la stimulation de l'adényl-cyclase au cours de ces expériences étaient submaximales.

La dexaméthasone augmente aussi légérement le nombre de récepteurs rénaux, mais cette augmentation ne suffit pas à expliquer la stimulation accrue par la lysine-vasopressine de l'adényl-cyclase observée après ce traitement ; le pourcentage d'augmentation de la stimulation de l'enzyme par la vasopressine est nettement supérieur à celui observé pour la fixation de ^{3}H-LVP (tableau XXII). Cette activation ne peut s'expliquer que par une action des glucocorticoïdes au niveau du couplage récepteurs/adényl-cyclase.

Par ailleurs, l'aldostérone et la dexaméthasone n'influencent pas la réaction enzymatique dans les conditions d'expérience "in vitro". On peut donc admettre que ces deux corticoïdes agissent au niveau rénal par l'intermédiaire de synthèses protéiques. Mais les désordres fonctionnels et métaboliques engendrés par la surrénalectomie sont importants et on ne peut totalement exclure la possibilité de leur intervention dans la diminution de l'activation de l'adényl-cyclase par l'ADH. Toutefois, les variations de l'acti-

vité adényl-cyclasique rénale ne sont pas en rapport direct avec l'état pathologique de l'animal. En effet, le maintien en vie de l'animal surrénalectomisé qui ne reçoit aucun apport supplémentaire en chlorure de sodium est précaire ; cependant, les activités adényl-cyclasiques évaluées à partir d'extraits membranaires provenant de ces animaux sont comparables à celles obtenues lorsque les rats reçoivent un traitement compensateur en chlorure de sodium. Après huit jours de surrénalectomie, la stimulation maximale de l'adényl-cyclase par la vasopressine est, dans les deux cas, diminuée d'environ 30 p. cent (figure 25).

Si l'aldostérone et la dexaméthasone sont capables d'augmenter légérement le nombre de récepteurs rénaux spécifiques de la vasopressine, seule la dexaméthasone intervient dans l'efficacité du processus de couplage récepteur/adényl-cyclase. On peut donc penser qu'un composé protéique dont la synthèse est contrôlée par les glucocorticoïdes doit intervenir au cours de l'étape qui suit l'occupation des sites récepteurs par les molécules hormonales et qui conduit à l'activation de l'adényl-cyclase.

Dans nos conditions expérimentales, la corticostérone, glucocorticoïde naturel du Rat, n'augmente pas la stimulation de l'adényl-cyclase par la vasopressine, amoindrie après surrénalectomie. De même, BRAUN et HECHTER (1970) ont montré que le cortisol intervenait moins efficacement que la dexaméthasone pour intensifier l'activation par la corticotrophine du système adényl-cyclasique de cellules adipeuses de rats surrénalectomisés. Cette inefficacité ne reçoit pas d'explications décisives. On peut simplement remarquer que chez le Rat, la vitesse de disparition de la corticostérone est rapide : deux heures après une injection de 800 µg de corticostérone à des animaux surrénalectomisés, nous avons observé une concentration plasmatique de ce glucocorticoïde atteignant seulement 0,1 µg/ml (technique de mesure de fluorescence selon la méthode de MATTINGLY, 1962). Le taux de corticostérone circulante, déterminé chez le Rat normal est de 0,2 µg/ml, il est toujours inférieur à 0,04 µg/ml chez le Rat surrénalectomisé qui ne reçoit aucun traitement hormonal. Ces valeurs sont en accord à celles trouvées par DALLMAN et coll. (1972). D'autre part, FELDMAN et coll. (1973) a mis en évidence, dans le rein de Rat, des récepteurs (type II) qui ont une affinité plus grande pour la dexaméthasone que pour la corticostérone. On peut donc penser que ces deux glucocorticoïdes agissent différemment.

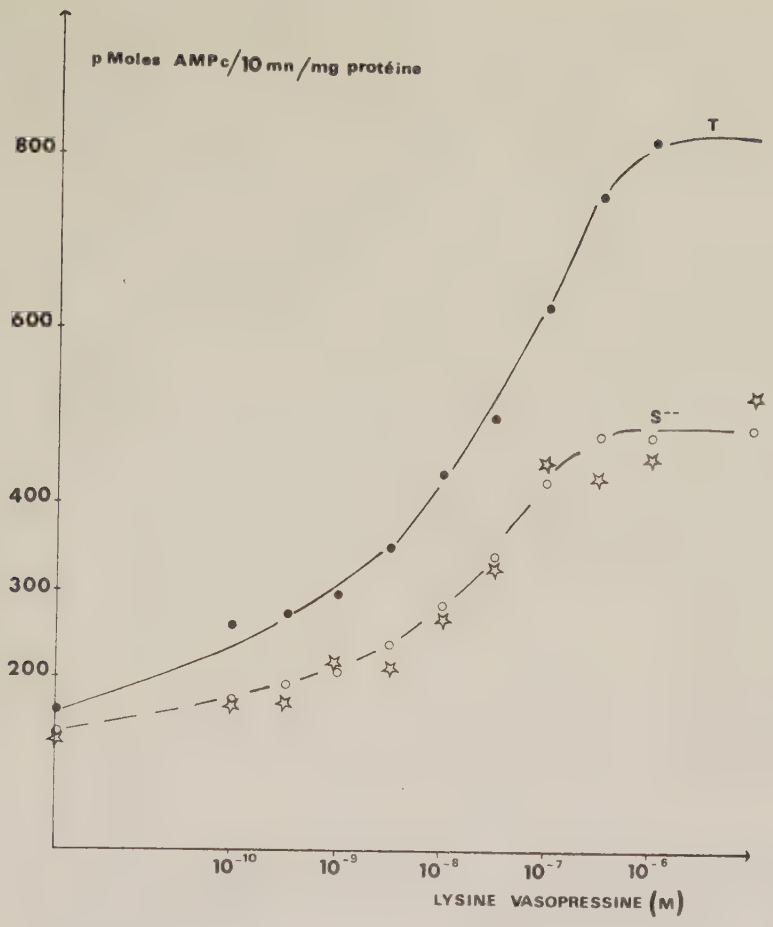


FIGURE 25 — *Stimulation par l'hormone antidiurétique de l'adényl-cyclase de medulla de rein de Rats témoins non surrénalectomisés (●), de rats surrénalectomisés recevant, comme boisson, une solution isctonique de chlorure de sodium (○) et de rats surrénalectomisés ne recevant aucun traitement (☆).*

Les animaux ont été sacrifiés huit jours après l'opération.

Chaque mesure est la moyenne de deux déterminations expérimentales indépendantes.

CHAPITRE QUATRIEME

RELATIONS POSSIBLES ENTRE L'EXCRETION RENALE HYDRO-ELECTROLYTIQUE ET L'ACTIVATION DE L'ADENYL-CYCLASE SENSIBLE A L'HORMONE ANTIDIURETIQUE

RELATIONS POSSIBLES ENTRE L'EXCRÉTION RÉNALE HYDRO-ÉLECTROLYTIQUE ET L'ACTIVATION DE L'ADÉNYL-CYCLASE SENSIBLE À L'HORMONE ANTIDIURÉTIQUE

Pour savoir si les modifications du système adényl-cyclasique que nous avons précédemment observées se répercutent sur la réponse rénale "in vivo", nous avons établi le bilan de l'excrétion urinaire de l'eau et des électrolytes chez les rats surrénalectomisés et soumis aux différents traitements. A l'aide de ces données, nous avons alors déterminé les clearances, osmotiques et de l'eau libre, pour estimer globalement l'activité de concentration et de dilution du rein dans nos différentes conditions expérimentales particulières. Bien que ces techniques apportent des informations limitées en ce qui concerne les processus de réabsorption ou de secretion d'une substance, elles constituent un des meilleurs moyens d'étude de la fonction rénale chez l'animal entier, non anesthésié.

A - CLEARANCES DE L'EAU LIBRE ET EXCRÉTION DES ÉLECTROLYTES CHEZ LE RAT SURRÉNALECTOMISÉ ET CHEZ LE RAT SOUMIS À DIFFÉRENTS TRAITEMENTS EN CORTICOÏDES

1 - SIGNIFICATION DES MESURES DE CLEARANCES

Le terme "clearance" appliqué à une substance donnée, utilisée pour la première fois par MÜLLER, INTOSCH et VAN SLYKE (1929) exprime l'efficacité relative avec laquelle le rein épure le plasma de cette substance ; elle est donnée par la formule $U.\dot{V}/P$ où U et P désignent les concentrations respectives de la substance dans l'urine et le plasma systémique et $\dot{V}$ le débit

TABLEAU XXIII — Excretion de l'eau et des électrolytes chez le Rat surrénalectomisé recevant un régime sodé et chez le Rat surrénalectomisé traité à l'aldostérone ou à la dexaméthasone.

(1) Le recueil urinaire a eu lieu entre la 44ème et 56ème heure
(2) et entre la 60ème et 72ème heure après la surrénalectomie.
(3) Les urines ont été recueillies au cours du 7ème jour ou du 8ème jour après l'opération.

Cinq jours après l'opération, les animaux ont reçu 2 fois par jour des injections intramusculaires de 12,5 µg d'aldostérone/100 g de poids corporel (S^{--} + NaCl + Aldo) ou de 100 µg de dexaméthasone/100 g de poids corporel (S^{--} + NaCl + Dexa). Des animaux témoins non surrénalectomisés ont été aussi soumis à un traitement identique à la dexaméthasone (T + Dexa).

Les différents paramètres ont été évalués à partir d'urines du jour recueillies après la première injection (x) ou après la cinquième injection (xx).

$m \pm sm$ = moyenne ± erreur standard

Animaux	Débit ml/12h/100 g	Créatinine µg/12h/100 g	Na^+ µEq/12h/100 g	K^+ µEq/12h/100 g	Osmolalité mOsm/kg	pH
	m ± sm	m ± sm	m ± sm	m ± sm	m ± sm	m ± sm
Témoins n = 24	0,54 ± 0,05	975 ± 54	86,0 ± 7,8	137,7 ± 7,1	1643 ± 79	6,30 ± 0,07
S^{--} + NaCl (1) n = 5	1,14 ± 0,10	964 ± 142	285,0 ± 21,9	127,2 ± 24,7	1628 ± 97	6,39 ± 0,06
S^{--} + NaCl (2) n = 12	1,35 ± 0,10	1190 ± 67	295,7 ± 16,1	221,7 ± 14,3	1724 ± 109	6,31 ± 0,006
S^{--} + NaCl (3) n = 17	2,58 ± 0,25	1135 ± 64	512,2 ± 58,4	292,6 ± 34,2	1272 ± 46	7,12 ± 0,07
S^{--} + NaCl + Aldo (xx) n = 8	0,65 ± 0,06	945 ± 120	184,2 ± 11,2	173,2 ± 29,7	1921 ± 107	6,80 ± 0,10
S^{--} + NaCl + Dexa (x) n = 13	3,98 ± 0,23	1650 ± 169	582,8 ± 48,9	561,8 ± 26,9	1060 ± 89	6,96 ± 0,04
S^{--} + NaCl + Dexa (xx) n = 10	2,01 ± 0,22	1491 ± 224	271,8 ± 28,4	286,4 ± 41,2	1523 ± 74	6,92 ± 0,07
T + Dexa (x) n = 9	3,14 ± 0,19	1506 ± 51	593,6 ± 50,0	448,0 ± 47,8	1205 ± 73	6,99 ± 0,03
T + Dexa (xx) n = 9	1,44 ± 0,12	1546 ± 80	221,8 ± 19,5	344,3 ± 30,1	1607 ± 104	6,64 ± 0,14

urinaire en ml/mn. Elle exprime donc le nombre de ml de plasma complètement débarrassés de cette substance en une minute. Ainsi le taux d'élimination globale des solutés peut être évalué par la clearance osmotique donnée par la formule : $Cosm = \frac{Uosm.\dot{V}}{P}$ où Uosm, Posm expriment respectivement la pression osmotique des urines et du plasma, exprimé en mOsm/kg (csmolalité), $\dot{V}$ étant le débit urinaire. Elle représente le volume théorique d'urines contenant les mêmes solutés à une concentration osmotique identique à celle du plasma.

De même, il est possible d'apprécier globalement l'activité de concentration ou de dilution du rein en calculant la clearance de l'eau libre (C_{H2O}). Celle-ci représente la quantité d'eau pure que le rein soustrait ou ajoute, par minute, à un fluide isoosmotique théorique, pour produire une concentration urinaire finale donnée. Elle se calcule selon la formule suivante : $C_{H2O} = \dot{V} - Cosm$. Si les urines sont hypertoniques, la clearance de l'eau est négative ; si les urines sont hypotoniques, celle-ci est alors positive.

Le tableau (XXIII) présente l'excrétion urinaire de l'eau et des électrolytes de rats surrénalectomisés et de rats surrénalectomisés recevant de l'aldostérone ou de la dexaméthasone. Les clearances osmotiques ainsi que celle de l'eau libre, de la créatinine sont résumées dans le tableau (XXIV). Nous avons aussi établi les rapports Na^+/créatinine et K^+/créatinine qui permettent d'évaluer seulement les modifications relatives aux mécanismes de réabsorption ou de secrétion tubulaire (tableau XXV), la créatinine étant une substance exclusivement filtrée.

2 - RÉSULTATS ET DISCUSSION DES MESURES

a) EXCRETION URINAIRE DE L'EAU ET DES ELECTROLYTES CHEZ LE RAT SURRENALECTOMISE SOUMIS A UN REGIME SODE

Le tableau (XXIV) montre que deux jours après la surrénalectomie, le débit urinaire ainsi que la clearance osmotique sont augmentés. La clearance de l'eau libre est nettement plus négative chez les animaux surrénalectomisés que chez les témoins. L'excrétion de sodium devient environ trois fois supérieure à celle des animaux normaux, tandis que celle du potassium ne varie pas de manière significative.

TABLEAU XXIV — Mesures de la clearance osmotique, de la clearance de l'eau libre et de la créatinine chez le Rat surrénalectomisé au cours des différentes expérimentations.

Les clearances ont été calculées à partir des formules habituelles en prenant P osm = 305 mOsm/kg comme valeur de l'osmolalité plasmatique et Pc = 4 µg/ml pour la concentration plasmatique de la créatinine.

Les différents groupes d'animaux expérimentaux (1), (2), (3), (X), (XX) sont explicités sous le tableau XXIII.

n.s. = non significatif

t = t du test de Student

Animaux	Débit µl/mn/100 g	C osm µl/mn/100 g	C H_2O µl/mn/100 g	Ccréatinine µl/mn/100 g	Test du t pour C H_2O	
					entre rats traités et rats S^{--} + NaCl (3)	entre rats traités et témoins
Témoins n = 24	0,70 ± 0,06	4,02 ± 0,32	- 3,26 ± 0,29	338 ± 22		
S^{--} + NaCl (1) n = 5	1,59 ± 0,13	8,47 ± 0,81	- 6,88 ± 0,70	335 ± 49		
S^{--} + NaCl (2) n = 12	1,88 ± 0,15	10,16 ± 0,83	- 8,23 ± 0,72	413 ± 23		
S^{--} + NaCl (3) n = 17	2,83 ± 0,14	11,34 ± 0,43	- 8,50 ± 0,39	394 ± 22		
S^{--} + NaCl + Aldo (xx) n = 8	0,91 ± 0,06	5,59 ± 0,36	- 4,68 ± 0,33	328 ± 38	t = 4,09 p < 0,001	t = 3,18 p < 0,01
S^{--} + NaCl + Dexa (x) n = 13	5,53 ± 0,23	18,80 ± 1,63	- 13,19 ± 1,58	573 ± 58	t = 3,09 p < 0,005	t = 6,19 p < 0,001
S^{--} + NaCl + Dexa (xx) n = 10	2,79 ± 0,22	13,31 ± 1,24	- 10,59 ± 0,99	518 ± 78	t = 2,19 p < 0,05	t = 7,69 p < 0,001
T + Dexa (x) n = 9	4,36 ± 0,19	17,53 ± 1,07	- 13,01 ± 1,07	514 ± 18	t = 4,53 p < 0,001	t = 10,57 p < 0,001
T + Dexa (xx) n = 9	2,00 ± 0,12	10,64 ± 1,08	- 8,57 ± 0,96	587 ± 28	t = 0,49 n.s.	t = 5,96 p < 0,001

TABLEAU XXV

Mesures des rapports Na^+/créatinine et K^+/créatinine évalués à partir d'urines de Rats surrénalectomisés, de Rats soumis à un traitement à l'aldostérone ou à la dexaméthasone et de rats témoins recevant de la dexaméthasone

Les animaux surrénalectomisés reçoivent une solution isotonique de chlorure de sodium. Les urines du jour sont recueillies entre la 44ème et 56ème heure (1), entre la 60ème et la 72ème heure (2) qui suivent l'opération et 7 à 8 jours après surrénalectomie (3). Cinq jours après l'opération, les animaux surrénalectomisés reçoivent un traitement à la dexaméthasone ou à l'aldostérone, comme indiqué sous le tableau (XXIII). Les électrolytes et la créatinine ont été évalués à partir d'urines du jour recueillies après la première injection (x) ou après la cinquième injection (xx).

Animaux	Na^+/créatinine	K^+/créatinine	"t" Na^+/créatinine entre rats expérimentaux et témoins	"t" Na^+/créatinine entre rats traités et S^{--} + NaCl (3)	"t" K^+/créatinine entre rats expérimentaux et témoins	"t" K^+/créatinine entre rats traités et S^{--} + NaCl (3)
Témoins n = 24	0,096 ± 0,010	0,148 ± 0,006				
S^{--} + NaCl (1) n = 5	0,316 ± 0,037	0,127 ± 0,029	t = 8,35 p < 0,001		t = 1,46 n.s	
S^{--} + NaCl (2) n = 12	0,254 ± 0,019	0,183 ± 0,014	t = 8,16 p < 0,001		t = 2,58 p < 0,01	
S^{--} + NaCl (3) n = 17	0,368 ± 0,027	0,218 ± 0,028	t = 11,4 p < 0,001		t = 3,15 p < 0,05	
S^{--} + NaCl + Aldo (xx) n = 8	0,189 ± 0,026	0,178 ± 0,022	t = 4,02 p < 0,001	t = 4,35 p < 0,001	t = 1,93 p < 0,1	t = 1,02 n.s
S^{--} + NaCl + Dexa (x) n = 13	0,426 ± 0,063	0,369 ± 0,040	t = 7,24 p < 0,001	t = 0,87 n.s	t = 8,00 p < 0,001	t = 3,18 p < 0,005
S^{--} + NaCl + Dexa (xx) n = 10	0,210 ± 0,032	0,225 ± 0,044	t = 4,60 p < 0,01	t = 3,45 p < 0,005	t = 3,16 p < 0,005	t = 0,14 n.s
T + Dexa (x) n = 13	0,440 ± 0,300	0,339 ± 0,283	t = 13,42 p < 0,01	t = 1,79 p < 0,1	t = 8,48 p < 0,001	t = 3,06 p < 0,01
T + Dexa (xx) n = 10	0,162 ± 0,016	0,262 ± 0,019	t = 3,65 p < 0,01	t = 6,04 p < 0,001	t = 7,44 p < 0,001	t = 1,18 n.s

Huit jours après l'opération, les modifications de la plupart de ces paramètres sont accentuées. L'excrétion potassique qui n'a pas changée au cours des 48 premières heures augmente de manière significative : le rapport K^+/créatinine devient environ 1,5 fois supérieur à celui des animaux témoins (tableau XXV). La clearance de la créatinine de tous les animaux surrénalectomisés ne présente pas de changements statistiquement significatifs.

b) EFFETS DE L'ALDOSTERONE SUR L'EXCRETION URINAIRE DE L'EAU ET DES IONS

Lorsque des rats surrénalectomisés depuis 5 jours sont soumis à un traitement à l'aldostérone (2 x 12,5 µg/jour/100 g), le débit urinaire, la clearance osmotique, celle de l'eau libre ainsi que le rapport Na^+/ créatinine diminuent de manière importante (2 à 3 fois) et se rapprochent ainsi des valeurs normales. Cependant, ces différentes variables restent légérement supérieures à celles des animaux témoins. En outre, le rapport urinaire K^+/créatinine plus élevé après trois jours de surrénalectomie n'est pas significativement modifié par le traitement à l'aldostérone.

Les résultats concernant le mouvement des ions sodium pouvaient être attendus et sont en accord avec ce que nous connaissons sur l'activité de l'aldostérone ou niveau du rein.

Grâce aux techniques de microponction, HIERHOLZER et ses collaborateurs (1965-1966) ont montré que les minéralocorticoïdes avaient une influence sur les mouvements du sodium au niveau du tubule proximal et distal. En effet, ces auteurs ont constaté que chez des rats surrénalectomisés, la réabsorption nette du sodium à partir d'une solution isotonique injectée au niveau des tubules proximaux est diminuée lorsqu'on la compare à celle des rats témoins. Cette anomalie disparaît après traitement des animaux à l'aldostérone. La réabsorption fractionnée du sodium était aussi réduite dans les tubules proximaux de rats surrénalectomisés perfusés avec un débit constant. Cependant, les estimations du temps de transit au niveau tubulaire proximal, pour des tubules non perfusés, ont montré que le liquide filtré restait plus longtemps en contact avec l'épithélium responsable de la réabsorption chez les rats surrénalectomisés que chez les rats intacts. De ce fait, les valeurs de réabsorption fractionnée de sel et d'eau, obtenus dans ces tubules proximaux de rats surrénalectomisés, sont normales ou même plus importantes.

Au niveau du tubule distal, ces mêmes auteurs ont montré, chez

le rat privé de surrénales, des altérations dans les mouvements des ions sodiques et potassiques. En effet, les concentrations en sodium du tubule distal mesurées au cours d'expériences de microponctions "sous flux libre" sont plus élevées chez le rat surrénalectomisé que chez l'animal intact. L'administration d'aldostérone ramène à la normale la concentration du fluide tubulaire. Une réduction des concentrations en potassium dans le tubule distal au cours d'expériences de microponction "en diurèse interrompue" a été également constatée.

A la suite de ces travaux, HIERHOLZER et ses collaborateurs concluent que l'aldostérone agit, dans les conditions normales, au niveau des tubules proximaux et distaux, mais que les troubles ioniques observés après la surrénalectomie résultent surtout des perturbations tubulaires distales concernant la réabsorption du sodium et la secrétion du potassium.

En outre, l'importante concentration en sodium du fluide tubulaire observée au début des segments distaux implique une réabsorption amoindrie de l'ion par la branche ascendante de l'anse de Henlé, chez l'animal surrénalectomisé.

La fuite sodée exagérée observée chez nos animaux surrénalectomisés peut donc s'expliquer, en grande partie, par les perturbations importantes concernant le transport des ions au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé et des tubules distaux.

Cependant, un effet proximal ne peut pas être totalement éliminé. En effet, si HIERHOLZER et ses collaborateurs (1966) observent chez les rats surrénalectomisés une diminution de la filtration glomérulaire responsable du débit amoindri du fluide tubulaire, nous ne remarquons pas de modifications de la clearance de la créatinine chez nos rats privés de surrénales recevant un complément en sodium.

Bien que, chez le rat, la créatinine ne soit pas la meilleure substance de référence pour apprécier la filtration glomérulaire rénale (du fait de sa faible concentration plasmatique) la mesure de sa clearance présente cependant le moyen le plus accessible pour estimer ce processus chez l'animal non anesthésié.

Le désaccord à ce sujet semble plutôt dépendre des conditions

expérimentales : en effet, une diminution de la filtration glomérulaire a généralement été trouvée, au cours d'expériences de microponction, chez le Rat surrénalectomisé, anesthésié (HIERHOLZER et coll., 1966 ; CORTNEY, 1969) ; par contre, UFFERMAN et SCHRIER (1972) ont montré, au cours d'expériences de surcharge hydrique, une chute de la filtration glomérulaire, seulement chez les chiens surrénalectomisés soumis à un régime pauvre en sel. En particulier, le taux de filtration de chiens privés de surrénales recevant une solution isotonique de chlorure de sodium comme boisson est comparable à celles des animaux normaux.

L'excrétion augmentée du potassium constatée dès le troisième jour suivant l'opération n'est pas en accord avec les observations de HIERHOLZER. Celle-ci peut cependant être liée à l'importance de la clearance osmotique et à celle de l'excrétion sodée observées chez ces animaux. En effet, GRANTHAM et coll. (1970), DUARTE et coll. (1971) ont remarqué une secrétion distale accrue du potassium lorsqu'un volume important du fluide tubulaire renfermant de nombreux ions sodium est délivré aux segments distaux et collecteurs.

En outre, on remarque que le pH urinaire s'accroît parallèlement à l'augmentation de l'excrétion des ions K^+, confirmant l'effet compétitif bien connu entre la secrétion des ions K^+ et celle des ions H^+.

Apparemment, chez ces animaux surrénalectomisés qui reçoivent depuis 8 jours une solution isotonique de chlorure de sodium en guise de boisson, tout se passe comme si l'on avait affaire à une diurèse saline conséquence de la fuite sodée importante due à l'absence d'aldostérone entretenue par l'apport sodé permanent délivré par l'eau de boisson. De ce fait, les rats excrètent une urine abondante et peu concentrée en dépit d'une clearance très négative de l'eau libre.

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine des valeurs très négatives des clearances de l'eau libre trouvée chez les animaux surrénalestomisés :

α - comme dans le cas d'une diurèse osmotique, le fluide tubulaire délivré aux différentes parties du néphron est plus important ; une plus grande quantité de solutés y sera réabsorbée ; il s'ensuit un transport plus intense de l'eau vers les milieux interstitiels.

β - par ailleurs, la concentration plasmatique élevée de l'hormone antidiurétique augmente la réabsorption de l'eau au niveau des tubules distaux et collecteurs.

γ - un dernier argument, sûrement un des plus importants, est l'absence de glucocorticoïdes ; en effet, STOLTE et coll. (1968) ont montré que la perméabilité osmotique à l'eau des tubules distaux augmentait après surrénalectomie et redevenait normale à la suite d'un traitement à la cortisone ou à la dexaméthasone. La capacité des glucocorticoïdes à diminuer la perméabilité osmotique à l'eau de la vessie de crapaud a aussi été mise en évidence par MARUMO en 1968.

Bien que l'aldostérone réduise de manière importante les pertes sodées engendrées par la surrénalectomie, on remarque cependant que dans nos conditions expérimentales, l'excrétion de ce cation, chez les animaux privés de surrénales et traités, reste légérement supérieure à celle des témoins. Le régime sodé imposé à nos animaux qui reçoivent comme seule boisson une solution isotonique de NaCl en est probablement la cause ; ceci peut aussi expliquer les valeurs légérement plus élevées des clearances osmotiques, de l'eau libre et du rapport K^+/créatinine.

c) MODIFICATIONS DE L'EXCRETION URINAIRE DES IONS ET DE L'EAU A LA SUITE D'UN TRAITEMENT A LA DEXAMETHASONE

L'administration de dexaméthasone (100 µg/100 g de poids corporel, deux fois par jour) chez les rats surrénalectomisés depuis 5 jours ne corrige pas les perturbations de l'excrétion urinaire engendrées par la surrénalectomie (tableau XXIII). On constate, en outre, des modifications supplémentaires dues aux effets pharmacologiques propres à la dexaméthasone.

A la suite d'une seule injection de dexaméthasone, le débit urinaire, la clearance osmotique, l'excrétion potassique ainsi que le rapport K^+/créatinine, toutes valeurs déjà élevées chez l'animal surrénalectomisé s'accroissent à nouveau de manière significative. La clearance de l'eau libre devient plus négative en dépit d'une osmolalité plus faible. Le rapport Na^+/créatinine n'est, par contre, pas modifié, alors que la clearance de la créatinine est accrue.

L'augmentation de la filtration glomérulaire due à l'adminis-

tration du glucocorticoïde (FINKENSTAEDT et coll., 1954 ; GARROD et coll., 1955 ; LIDDLE et coll., 1954) peut expliquer en partie l'accroissement du débit urinaire et de la clearance osmotique. Celle-ci est susceptible de rendre compte de la réabsorption plus importante de l'eau libre.

Outre ces observations, on remarque un effet majeur de la dexaméthasone sur la secrétion des ions K^+, le rapport K^+/créatinine étant très significativement augmenté de 74 p. cent. La dexaméthasone se montre capable d'influencer l'excrétion des ions K^+ sans modifier la réabsorption du sodium.

Il est généralement admis, depuis les expériences de BERLINER (1954) que la majeure partie du potassium est réabsorbée au niveau proximal, tandis que la partie excrétée vient toujours s'ajouter au liquide tubulaire dans les segments distaux du néphron. A ce niveau, la secrétion de potassium dépend énormément des conditions métaboliques : à la suite de perfusions intraveineuses de solution hypertonique ou isotonique de chlorure de sodium, de sulfate de sodium, de chlorure de potassium, l'excrétion potassique devient importante (MALNIC et coll., 1966 ; GIEBISCH et WINDHAGER, 1973) ; au contraire une réabsorption nette de ce cation a lieu lorsque les animaux sont soumis à un régime pauvre en sodium et en potassium. L'augmentation de l'excrétion des ions potassium peut donc être la conséquence soit d'une diminution de la réabsorption de ce cation au niveau proximal (CORTNEY, 1969), soit d'une augmentation de sa secrétion au niveau des parties distales du néphron.

Des administrations répétées de dexaméthasone, durant trois jours, à des animaux surrénalectomisés, conduisent à des modifications importantes de l'excrétion des solutés comparées aux valeurs observées à lasuite d'une seule injection de stéroïde. Au cours du 3ème jour de traitement, à la suite de la 5ème injection, les rapports Na^+/créatinine et K^+/créatinine diminuent respectivement de 53 p. cent et de 49 p. cent, la clearance de la créatinine restant inchangée. La réduction de l'excrétion des deux principaux électrolytes entraîne une baisse de la clearance osmotique et du débit urinaire. L'osmolarité est augmentée de 47 p. cent, cependant la clearance de l'eau libre ne varie pas de manière significative (tableau XXIV).

Ces résultats suggèrent qu'à la suite de plusieurs injections, la dexaméthasone est capable de stimuler la réabsorption du sodium. Evidemment, les mesures globales de clearance des différentes substances et de l'excrétion

des solutés ne nous permettent pas de préciser le segment du néphron où le glucocorticoïde exerce son action. Cependant, un effet positif du cortisol sur la réabsorption des rions sodés au niveau de l'anse de Henlé a été mis en évidence par SAKAI et MURAYAMA (1970). Ces auteurs ont remarqué que chez le Rat surrénalectomisé le contenu en sodium du perfusat rénal ponctionné dans la première partie du segment distal diminuait à la suite d'une corticothérapie de trois jours. Cependant, rien ne nous permet de réfuter un effet de la dexaméthasone sur le transport des ions sodium au niveau des tubules plus distaux.

Lorsqu'un traitement analogue est imposé à des rats témoins non surrénalectomisés, contre toute attente, à la suite d'une seule injection de dexaméthasone, l'excrétion sodée augmente d'un facteur 5 et celle du potassium est environ deux fois supérieure à la normale ; l'augmentation de 31 p. cent de la clearance à la créatinine ne permet pas d'expliquer à elle seule la fuite urinaire importante des électrolytes. L'excrétion urinaire de ces animaux présente de nombreuses caractéristiques identiques à celles des rats surrénalectomisés observés à la suite d'une seule injection du stéroïde ; seul le rapport K^+/créatinine présente une valeur légérement inférieure (tableau XXV).

L'augmentation importante de l'excrétion sodée consécutive à l'administration de dexaméthasone, observée chez ces animaux intacts peut s'expliquer par une diminution de la secrétion d'aldostérone. En effet, MÜLLER (1970) a montré que dans les conditions d'expériences "in vitro", les glandes surrénales provenant d'animaux ayant reçu de la dexaméthasone ou de la 9-fluorocortisol ou de l'ACTH secrètent 70 à 90 p. cent moins d'aldostérone que les tissus surrénaux d'animaux non traités. En outre, MIAHLE et coll. (1971) ont constaté que la dexaméthasone exerce un effet inhibiteur directe sur les glandes surrénales.

A la suite d'injections répétées de dexaméthasone, les pertes sodées diminuent environ d'un facteur 3 : après trois jours de traitement, à la suite de la 5ème administration, le rapport Na^+/créatinine n'est plus que de 35 p. cent supérieur aux valeurs habituelles. Par contre, le rapport K^+/créatinine ne varie pas de manière aussi importante ; bien que réduit, il reste légérement supérieur à la normale. L'effet tardif de la dexaméthasone sur la réabsorption du sodium, déjà observé chez les animaux surréna-

lectomisés, est à nouveau confirmé ; dans ce cas, la dexaméthasone est capable de diminuer la fuite sodée induite au cours de sa première injection et ainsi corrige son propre effet primaire.

En résumé, ces résultats montrent que la dexaméthasone provoque une augmentation immédiate de l'excrétion des ions potassium tant chez l'animal intact que surrénalectomisé. CHABRIA et GAITONDE (1966) ont aussi mis en évidence une fuite potassique importante chez le Rat, à la suite d'une seule injection de dexaméthasone (500 µg/kg) ; cet auteur démontre en outre que l'excrétion du potassium est, dans ces conditions, maximale, car l'administration simultanée de polythiazide ne provoque pas une perte urinaire plus importante de cet électrolyte.

Vis-à-vis de l'excrétion sodée rénale, le comportement des glucocorticoïdes évolue avec la répétition des injections. Après trois jours de traitement, la dexaméthasone est capable d'augmenter la réabsorption des ions sodium chez l'animal surrénalectomisé. De même, la fuite sodée provoquée chez le Rat non surrénalectomisé à la suite d'une seule injection de dexaméthasone tend à disparaître après plusieurs administrations. Tout se passe comme si le rein "échappait" à l'action primaire du glucocorticoïde en stimulant un mécanisme qui permette le transport du sodium.

B - Schémas d'explications possibles de l'effet de la dexaméthasone sur la stimulation de l'adényl-cyclase par l'hormone antidiurétique

1 - Influence sur l'excrétion hydrique des modifications du mécanisme d'action de la vasopressine engendrées par la surrénalectomie et les glucocorticoïdes

Nous avons démontré, au chapitre précédent, que la surrénalectomie diminue la stimulation de l'adényl-cyclase par la vasopressine et que, par

contre, les glucocorticoïdes augmentent l'activation de l'enzyme par l'hormone. On peut alors se demander si les perturbations du mécanisme d'action de l'hormone antidiurétique observées après surrénalectomie se répercutent sur la réponse du rein à l'ADH. Cependant, il est difficile d'apprécier cette réponse ; en effet, si la clearance de l'eau libre permet d'apprécier globalement le pouvoir de réabsorption de l'eau par le rein, elle ne reflète pas forcément l'activité rénale de l'hormone antidiurétique. Nous venons effectivement de constater que dans nos conditions expérimentales, il s'installe chez le Rat surrénalectomisé une diurèse saline accompagnée d'une clearance de l'eau libre fortement négative. Nous avons alors fait remarquer que la réabsorption importante d'eau peut s'expliquer en grande partie par l'ampleur du débit osmolaire et par l'absence de glucocorticoïdes qui, selon STOLTE et ses collaborateurs (1968), imperméabilisent les tubules rénaux. Aussi, dans ces conditions, la clearance de l'eau libre ne peut être ni le reflet de la concentration plasmatique en ADH, ni le reflet de son efficacité sur les tubules rénaux.

Que signifient alors les modifications enzymatiques observées après surrénalectomie ? Que dénote l'influence des glucocorticoïdes sur la sensibilité à l'ADH du système adényl-cyclase ? A-t-elle une signification au niveau des mécanismes de concentrations ? Nous n'avons pas pour le moment de réponses précises à ces questions. Nous pouvons seulement constater qu'après surrénalectomie la stimulation de l'adényl-cyclase par l'ADH diminue alors que la présence d'un hypervasopressinisme et l'absence de glucocorticoïdes supposent une perméabilité à l'eau augmentée. Par contre, la stimulation de l'enzyme est fortement amplifiée par la dexaméthasone, alors que l'on sait que les glucocorticoïdes imperméabilisent les tubules rénaux. Ces modifications, jouant en sens contraire sur la perméabilité à l'eau, sembleraient agir dans le but de régulariser la réabsorption de l'eau : en absence de glucocorticoïdes, quand la perméabilité à l'eau est très augmentée, l'activité adényl-cyclasique sensible à l'hormone antidiurétique est diminuée ; par contre, en présence de dexaméthasone qui tend à imperméabiliser la membrane tubulaire, la stimulation de l'adényl-cyclase par l'ADH est très intensifiée.

Précédemment, nos propres expériences nous ont permis de suggérer que l'action de la dexaméthasone sur l'activité adényl-cyclasique vasopressine

dépendante s'effectuait au niveau du processus de couplage récepteurs/adényl-cyclase, par l'intermédiaire d'une biosynthèse de protéine. Mais le mécanisme par lequel les glucocorticoïdes imperméabilisent la membrane n'est pas encore établi : on ne sait pas s'il s'agit d'une interaction des stéroïdes avec les lipides membranaires, comme cela a été suggéré par certains auteurs (GERSHFELD et PAK, 1968 ; DALTON et SNART, 1967) ou si le glucocorticoïde est capable de contrôler dans la cellule rénale la synthèse d'une autre substance (différente de celle qui régule l'activité de l'adényl-cyclase) qui pourrait s'incorporer aux membranes cellulaires, rendant compte des propriétés imperméabilisantes.

Une activité analogue de la dexaméthasone a été mise en évidence par BALLARD et TOMKINS (1969) qui ont montré que ce glucocorticoïde pouvait induire au niveau des cellules HTC (hepatoma tissue culture cells), outre la tyrosine aminotransférase, une protéine basique qui s'incorpore aux membranes cellulaires. Dans ce cas, les propriétés adhésives de ces cellules augmentent.

2 - UN RAPPROCHEMENT ENTRE LA RÉABSORPTION SODÉE ET L'ACTIVITÉ DE L'ADÉNYL-CYCLASE SENSIBLE À L'HORMONE ANTIDIURÉTIQUE EST-IL POSSIBLE ?

Si l'effet de l'ADH sur la réabsorption de l'eau au niveau des tubules contournés distaux et des canaux collecteurs est incontestable, son activité sur la réabsorption du sodium a été avancée à plusieurs reprises, mais n'a malheureusement pas encore reçu de preuves expérimentales directes. Comme l'a suggéré MOREL (1964-1967), une stimulation par l'hormone antidiurétique de la réabsorption active du sodium par les parois de la branche ascendante de l'anse de Henlé pourrait contribuer à l'établissement du gradient de pression osmotique corticocapillaire.

En outre, HELMAN et coll. (1971) ont montré que la présence d'ADH modifiait la résistance électrique membranaire des tubes collecteurs isolés ; ces auteurs suggèrent alors que la vasopressine augmente le transport actif du sodium sans altérer la perméabilité de la membrane à cet ion. Bien qu'en contradiction avec les résultats d'autres équipes de recherche (ULLRICH et coll., 1969 ; TADOKORO et coll., 1968), les mesures de flux sodé unidirec-

tionnel effectuées par FRINDT et BURG (1972) apportent des arguments supplémentaires en faveur de cette dernière hypothèse. Par analogie avec l'activité natriférique des hormone neurohypophysaires sur la vessie de crapaud et la peau des Amphibiens, on peut penser que si l'ADH joue un rôle dans la réabsorption du sodium dans le rein de mammifère, elle exercerait son action par l'intermédiaire de l'AMP cyclique.

De notre côté, nous avons montré qu'un traitement de trois jours à la dexaméthasone chez des rats surrénalectomisés provoquait une stimulation du système adényl-cyclasique sensible à la vasopressine ; parallèlement nous avons constaté, chez ces mêmes animaux, une diminution des pertes sodées engendrées par la surrénalectomie. Unemême concomitance entre réabsorption sodée augmentée et stimulation adényl-cyclasique vasopressine dépendante accrue est observée chez les rats témoins non surrénalectomisés, à la suite d'une corticothérapie analogue de 3 jours. L'augmentation de la stimulation de l'activité enzymatique sensible à l'hormone antidiurétique contemporaine de la réabsorption sodée intensifiée peut constituer un argument supplémentaire en faveur d'une activité de l'hormone antidiurétique sur la réabsorption du sodium.

Si, à la lueur des différentes données bibliographiques, nous nous sommes permis d'émettre ces dernières hypothèses, nos propres résultats ne nous permettent pas d'apporter une interprétation fonctionnelle rigoureuse des modifications de l'activité de l'adényl-cyclase sensible à l'hormone antidiurétique induites par la surrénalectomie et les corticoïdes.

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

Arrivée au terme de l'exposé de notre travail, nous comptons, dans ce chapitre, résumer et discuter les principales conclusions que nous avons pu tirer de cette étude et qui apportent des éléments nouveaux à la connaissance des interactions entre hormone antidiurétique et hormones corticosurrénales.

C'est grâce à l'utilisation d'une technique radioimmunologique suppléant le dosage biologique mal commode de l'hormone antidiurétique que nous avons pu établir le bilan de la vasopressine, nécessaire à l'étude du rôle des corticoïdes sur la secrétion de l'hormone antidiurétique. Ce dosage n'a été possible qu'après obtention d'anticorps spécifiques de l'arginine-vasopressine et préparation d'une hormone marquée convenable. Bien que la lysine-vasopressine iodée ait perdu son activité biologique, la molécule conservait toutes ses propriétés immunologiques, se comportant vis-à-vis des anticorps de manière identique à la lysine-vasopressine de synthèse. En possession d'anticorps spécifiques anti-vasopressine et d'hormone marquée immunologiquement compétente, nous avons alors défini les conditions de l'essai radioimmunologique de l'ADH et utilisé couramment cette technique pour évaluer l'hormone dans les tissus nerveux et dans les urines. D'utilisation facile, cette technique permet de doser simultanément un nombre important d'échantillons. De ce fait, nous avons essayé dans la mesure du possible de limiter les erreurs en évaluant au cours d'un même dosage l'hormone antidiurétique d'extraits provenant d'animaux témoins et expérimentaux ; ce qui est pratiquement impossible avec le dosage biologique.

Les résultats obtenus des différents dosages nous ont alors permis de montrer une action des glucocorticoïdes sur la synthèse de l'hormone antidiurétique ; en effet, leur absence entraîne une production accrue de vasopressine conduisant à une accumulation de l'hormone dans la neurohypophyse. La concentration plasmatique plus élevée et l'excrétion urinaire plus importante du peptide neurohypophysaire supposent que la libération de l'hormone est aussi augmentée. Mais, dans ces conditions, l'augmentation de la synthèse de l'ADH est plus importante que l'accroissement de sa libération,

et l'on est en mesure de se demander pourquoi la libération de l'hormone à partir de la neurohypophyse ne suit pas le rythme de la synthèse et si la libération de l'ADH est vraiment soumise en permanence aux contrôles des glucocorticoïdes. En effet, s'il est indubitable que l'animal surrénalectomisé répond à un stress en libérant des quantités plus importantes d'hormone antidiurétique, comparées à celles secrétées par des témoins soumis au même stress (BURLET et coll., 1971), et si le cortisol empêche une telle libération (TRAVIS et coll., 1971), nos expériences ne nous permettent pas de conclure que l'ADH est constamment libérée à un taux supérieur à la normale en absence de glucocorticoïdes. En considérant ces données connues et nos observations, il serait plutôt possible de concevoir l'hypothèse suivante : l'absence de glucocorticoïdes induit une synthèse accrue de l'hormone antidiurétique qui serait libérée en plus grande quantité seulement après une stimulation. L'étalement des résultats de la vasopressinémie observé chez les rats surrénalectomisés recevant un régime enrichi en sodium constitue un argument en faveur de cette hypothèse. L'augmentation de l'excrétion urinaire de l'ADH serait alors le reflet d'une libération exagérée d'hormone en réponse à certains stimuli qui ont pu intervenir au cours du prélèvement urinaire.

De plus, nous n'avons pas mesuré, après surrénalectomie, le volume des différents compartiments liquidiens, et il est probable qu'il persiste chez les animaux privés de surrénales une légère contraction des espaces extra-cellulaires, en dépit du chlorure de sodium présent à une concentration de 0,9 p. cent dans l'eau de boisson. Dans ce cas, l'hormone antidiurétique serait libérée en réponse à ce stimulus ; cette stimulation serait cependant minime comparée à celle observée chez les animaux surrénalectomisés qui ne reçoivent pas de sodium et elle n'empêche pas l'accumulation de l'ADH dans le lobe nerveux due à l'augmentation de synthèse. La correction de l'hypervasopressinisme et le retour vers les valeurs normales de l'activité rénine plasmatique (MARTINEAUX, à paraître) après le traitement à l'aldostérone serait en faveur de cette hypothèse. Mais l'aldostérone pourrait aussi agir par le biais du système rénine-angiotensine. En effet, l'angiotensine est capable de provoquer la secrétion d'ADH (BONJOUR et coll., 1970 ; MOUW et coll., 1971) et des récepteurs à l'angiotensine II sont présents dans l'hypothalamus (SAKAI et coll., 1974) on peut alors se demander si la synthèse et la libération d'ADH ne sont pas en partie influencées par les variations de ce système.

Aux expériences déjà anciennes montrant que les glucocorticoïdes empêchent la libération d'ADH déclenchée par la nicotine et autres stimuli stressants, viennent s'ajouter, pour confirmer cette activité inhibitrice, les expériences plus récentes de VILHARDT (1970, a). Cet auteur a mis en évidence dans certaines conditions expérimentales "in vitro" une influence des glucocorticoïdes sur la secrétion de la vasopressine par des neurohypophyses de rats en culture ; en effet, la prednisolone présente dans le milieu de culture empêche l'augmentation du relâchement de l'hormone antidiurétique par la glande, lorsqu'elle est excitée par un excès d'ions potassium ; cependant, ce corticoïde n'empêche apparemment pas la libération de vasopressine en absence de tout stimulus. Cette constatation viendrait à l'appui de notre hypothèse stipulant que les glucocorticoïdes n'interviennent probablement pas dans la libération normale de l'hormone antidiurétique, mais agissent seulement sur la glande excitée en empêchant un relâchement excessif de la vasopressine en cas de stimulation.

Par contre, l'augmentation de la teneur en ADH de la glande des animaux surrénalectomisés (recevant une solution isotonique de NaCl) qui présentent un hypervasopressinisme ne peut s'expliquer que par une augmentation de la synthèse hormonale. Ceci semble bien lié à l'absence de glucocorticoïdes, puisqu'un traitement à la dexaméthasone empêche l'accumulation d'ADH dans la neurohypophyse. Cette corticothérapie ne peut représenter un traitement substitutif adéquat puisque les propriétés pharmacologiques de la dexaméthasone entraînent des perturbations rénales, qui peuvent être à l'origine de l'augmentation de la libération d'ADH observée à nouveau après plusieurs jours de traitement. Remarquons cependant que la vasopressinémie doit rester malgré tout normale, puisque le rapport ADH urinaire/créatinine urinaire est analogue à celui des témoins.

En résumé, la surrénalectomie met en évidence une dissociation entre synthèse et libération d'ADH. Les glucocorticoïdes semblent alors agir indépendamment sur l'un et l'autre processus : nos résultats admettent une action des glucocorticoïdes sur la synthèse de l'hormone antidiurétique ; n'intervenant peut-être pas au niveau de la libération dans les conditions normales, il est cependant certain qu'ils empêchent la secrétion d'ADH en réponse à une excitation.

Suivant la suggestion de GAUNT (1949, nous avons non seulement

recherché des interéactions entre hormone antidiurétique et hormones corticosurrénaliennes au niveau du diencéphale mais aussi au niveau du tubule rénal.

Nos expériences nous ont alors conduite à mettre en évidence une intervention des corticoïdes dans le mécanisme d'action rénale de l'hormone neurohypophysaire.

Il est incontestable que les corticoïdes influencent le système adényl-cyclasique sensible à la vasopressine. L'étude simultanée de la capacité de fixation de la lysine-vasopressine tritiée sur les membranes plasmiques de la medulla rénale et l'activation par l'hormone de l'adényl-cyclase nous a permis de préciser l'étape modifiée par l'absence de corticoïdes ou par les différents traitement. Ceci a été possible grâce aux corrélations étroites que nous avons pu établir entre la fixation de la ^{3}H-LVP aux membranes et la stimulation de l'enzyme par l'hormone, permettant de concevoir que dans nos conditions expérimentales les sites retenant spécifiquement l'hormone sont impliqués dans l'activation de l'adényl-cyclase vasopressine dépendante. En effet, les courbes "dose-réponse" représentant la fixation de ^{3}H-LVP évoluent à l'intérieur d'une même gamme de concentrations hormonales comme celles qui représentent la stimulation de l'adényl-cyclase en fonction des concentrations croissantes de LVP ; et les valeurs d'affinité apparente déterminées sur ces deux courbes sont comparables. De plus, l'inhibition de la liaison du peptide marqué en présence de certains analogues structuraux de la lysine-vasopressine correspond étroitement à l'activation de l'adényl-cyclase par ces analogues.

Ainsi, la diminution de la stimulation maximale de l'adényl-cyclase par la vasopressine observée après surrénalectomie, peut s'expliquer en partie par une diminution du nombre de récepteurs rénaux, mais surtout par une baisse de l'efficacité du "couplage récepteur/adényl-cyclase", étape qui suit la fixation de l'hormone et qui mène à la stimulation de l'enzyme.

L'aldostérone comme la dexaméthasone augmentent légérement le nombre de récepteurs rénaux. Alors que l'action de l'aldostérone sur le système adényl-cyclasique rénal sensible à l'hormone antidiurétique peut s'expliquer simplement par un effet sur le nombre de récepteurs, l'activation importante du système observée après traitement à la dexaméthasone démontre que ce glucocorticoïde intervient en plus et surtout au niveau du processus de couplage. Ces corticoïdes n'agissant pas sur la réaction enzymatique "in vitro", leur activité ne peut s'exercer, d'après ce que nous connaissons du

mode d'action des hormones surrénaliennes, que par l'intermédiaire d'une synthèse protéique.

Le mode d'action des corticoïdes sur l'activité de l'adényl-cyclase sensible à l'hormone antidiurétique serait alors double :

-Minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes interviendraient en modulant le nombre de récepteurs hormonaux impliqués dans l'activité du système enzymatique. Notons aussi que l'activité de base de l'adényl-cyclase et sa stimulation par le fluorure de sodium ne sont altérées ni par la surrénalectomie, ni par les traitements aux corticoïdes. Si l'on admet que le fluorure de sodium active au maximum l'adényl-cyclase, ces observations indiqueraient que le nombre de molécules d'enzyme n'est pas affecté dans ces conditions. Cependant, il est aussi possible que seulement une petite fraction de l'adényl-cyclase présente dans la medulla de rein soit sensible à la vasopressine : l'hormone serait alors plus efficace vis-à-vis de cette activité enzymatique que ne le serait le fluorure de sodium. Aussi, un changement quelconque du système adényl-cyclasique soumis à la stimulation de la vasopressine serait alors difficilement détectable au niveau de l'activité de base de l'enzyme et dans les conditions de l'activation par le fluorure de sodium.

-Une seconde régulation s'exercerait aussi à l'étape succédant à la fixation de l'hormone sur les récepteurs. Cette activité au niveau du couplage récepteur/adényl-cyclase serait essentiellement sous le contrôle des glucocorticoïdes. On est alors amené à penser qu'un composé de nature protéique, dont la synthèse est sous le contrôle des glucocorticoïdes, serait impliqué dans cette étape particulière du mécanisme d'action de l'hormone antidiurétique.

Les interactions entre ADH et hormones corticosurrénaliennes ne s'intégrent donc pas seulement dans un schéma de régulation général du métabolisme hydrominéral faisant principalement intervenir l'action minéralocorticoïde de l'aldostérone et l'activité rétentrice d'eau de l'ADH. Nos expériences montrent, en effet, que les glucocorticoïdes exercent aussi un contrôle sur la sécrétion de l'hormone antidiurétique et sur son mécanisme d'action au cours d'insuffisances surrénales, la suppression ou la diminution de ces contrôles

peuvent donc induire des modifications de la synthèse du peptide neurohypophysaire, ainsi que de son processus d'action au niveau de son organe-cible périphérique. On peut se demander si ces changements sont indépendants l'un de l'autre ou si c'est l'absence de régulation centrale, entraînant une sécrétion accrue d'ADH, qui modifie la réponse à l'hormone de l'adényl-cyclase rénale et réciproquement : en effet, il est possible de concevoir que l'hypervasopressinisme puisse être la cause de la baisse de la stimulation de l'adényl-cyclase ; l'ADH étant présente à une concentration plus élevée, l'activité de ce système enzymatique rénal serait alors réduite par diminution de sa sensibilité à la neurohormone ; ou bien, du fait que la réponse à la vasopressine du système adényl-cyclasique rénal diminue en absence de glucocorticoïdes, la secrétion d'ADH augmenterait de manière à compenser ce déficit. Mais aucun argument ne nous autorise actuellement à retenir l'une ou l'autre hypothèse.

Par ailleurs, les modifications observées au niveau du mécanisme d'action de l'hormone antidiurétique sont difficilement applicables à la physiologie rénale, bien que la diminution de la stimulation maximale de l'adényl-cyclase semble de prime abord apporter une hypothèse explicative à la diurèse importante et à l'osmolalité faible observées chez les animaux surrénalectomisés malgré l'augmentation de la vasopressinémie. Cependant, comme nous l'avons fait remarquer au chapitre IV, l'importance du débit urinaire et l'élimination d'une urine plus concentrée sont à mettre sur le compte d'une diurèse saline provoquée par la perte d'ions sodium entretenue par l'apport sodé permanent fourni avec l'eau de boisson. En outre, les chiffres élevés de la réabsorption d'eau libre (TcH_2O), malgré la faible concentration urinaire, ne permettent pas d'apprécier l'efficacité de l'hormone antidiurétique au niveau du rein ; en effet, cette réabsorption d'eau peut trouver son origine non seulement dans l'augmentation de la vasopressinémie, mais aussi dans la perméabilité à l'eau accrue du néphron due à l'absence de glucocorticoïdes ; elle peut être aussi la conséquence de l'élimination importante de substances osmotiquement actives.

Cependant, certains auteurs ont pu établir une corrélation entre une stimulation réduite de l'adényl-cyclase par la vasopressine, activation mesurée "in vitro" et une altération de la réponse des tubules rénaux à l'hormone antidiurétique. Aussi, à la suite d'un traitement au lithium, WRAEE et coll. (1972) d'une part, DOUSA et coll. (1973) d'autre part, ont montré une baisse de la stimulation maximale de l'adényl-cyclase rénale par la vasopres-

sine ; selon ces auteurs, cette baisse de l'activation enzymatique pourrait, du moins en partie, être à l'origine de la polyurie résistante à la vasopressine induite par ce cation. Par ailleurs, certaines substances capables de provoquer un diabète insipide néphrogénique : l'acide vasopressinoïque (DOUSA et coll., 1970), certaines prostaglandines (KALISKER et DYER, 1972), le BAX 439 (DOUSA et coll., 1973), la dimethylchlortetracycline (DOUSA et coll., 1974), réduisent la stimulation maximale de l'adényl-cyclase par la vasopressine, lorsqu'elles sont ajoutées "in vitro" aux tests d'activation enzymatique. Plus récemment, DOUSA et VALTIN (1974) ont montré que la stimulation maximale de l'adényl-cyclase rénale par des concentrations saturantes d'AVP était très significativement réduite chez des souris qui présentent un défaut héréditaire de concentration urinaire ; cette baisse était très marquée chez les souris montrant un diabète insipide néphrogénique sévère (DI +/+), alors qu'elle était moins accentuée chez les souris présentant un diabète moins prononcé (DI +/-). Ces auteurs font alors ressortir qu'il peut exister dans ce cas une relation entre l'activité de l'adényl-cyclase stimulée par une dose maximale d'AVP (10^{-6} M) et l'osmolarité urinaire ; ils suggèrent en outre (mais ne prouvent pas) que les perturbations de la stimulation enzymatique sont à l'origine du défaut de concentration urinaire et de "la non réponse" du rein à la vasopressine observée chez les souris malades.

Bien que dans nos conditions expérimentales, à la suite d'un traitement de trois jours à la dexaméthasone, l'activité du système adényl-cyclasique rénal chez les animaux privés de surrénales soit augmentée en même temps que l'osmolarité (tableau XXIII) et le transport de l'eau libre (tableau XXV) les perturbations rénales provoquées par l'emploi à doses élevées de ce glucocorticoïde ne permettent pas d'établir d'emblée des relations cause-effet. Ceci est manifeste chez les rats intacts qui reçoivent un traitement à la dexaméthasone identique. Au cours du premier jour de traitement, la dexaméthasone provoque une fuite sodée et potassique importante qui entraîne une augmentation de la clearance osmotique qui est à l'origine de la réabsorption accrue d'eau libre. Bien que ces variations diminuent après trois jours de traitement, la clearance de l'eau libre reste plus négative que celle des animaux témoins ; elle est du même ordre de grandeur que celle évaluée chez les rats après 8 jours de surrénalectomie. Il est alors possible de remarquer que les modifications du système adényl-cyclasique varient en sens contraire : la stimulation, par l'ADH, de l'enzyme diminue après surrénalectomie, alors

qu'elle est fortement activée par le traitement à la dexaméthasone. Dans l'un et l'autre cas, les modifications de la TcH_2O semblent plutôt liées aux variations des pertes des substances osmotiquement actives.

S'il n'est pas possible d'établir des relations entre le transport de l'eau et l'activation de l'adényl-cyclase, nous avons cependant fait remarquer qu'il existait chez les animaux (témoins ou surrénalectomisés) traités à la dexaméthasone une certaine concomitance entre la réabsorption des ions sodium et la stimulation de l'adényl-cyclase par la vasopressine. Ceci nous conduirait à admettre une action de la vasopressine sur la réabsorption du sodium ; une telle activité de la vasopressine sur le transport du sodium au niveau de l'anse de Henlé a été suggérée à plusieurs reprises par MOREL (1964, 1967) mais n'a pas encore reçu de preuves expérimentales directes. Cependant, les expériences plus récentes de HELLMAN et coll. (1971) d'une part, de FRINDT et BURG (1972) d'autre part, sont en faveur d'une intervention du peptide neurohypophysaire sur les mouvements du sodium au niveau des tubes collecteurs du rein.

En conclusion, nos résultats confirment et précisent les interrelations entre hormone antidiurétique et hormones corticosurrénaliennes tant au niveau central qu'au niveau périphérique. En effet, s'il n'est pas possible d'attribuer aux glucocorticoïdes, dans les conditions normales, un rôle purement physiologique sur la libération d'ADH, nos résultats permettent cependant de concevoir un contrôle rétroactif des glucocorticoïdes sur la synthèse de la neurohormone.

Ils montrent en outre que les hormones surrénaliennes (minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes) influencent le système adényl-cyclasique rénal intervenant dans le mécanisme d'action de l'hormone antidiurétique. Minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes n'influencent que très légèrement le nombre des récepteurs rénaux fixant spécifiquement l'hormone antidiurétique mais les glucocorticoïdes interviennent surtout en activant l'étape ultérieure qui suit la fixation de l'hormone sur les sites récepteurs et qui conduit à la stimulation de l'adényl-cyclase. Mais, il est difficile d'attribuer à ces dernières données une signification physiologique.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

AHMED (A.B.J.), GEORGE (C.), GONZALES-AUVERT (C.), DINGMAN (J.F.)
Increased plasma arginine-vasopressin in clinical adrenocortical insufficiency and its inhibition by glucosteroids.
J. clin. Invest., 1967, 46, 111-123

AMATRUDA (T.T.), MULROW (P.J.), GALLAGHER (J.C.), SAWYER (W.H.)
Carcinoma of the lung with inappropriate antidiuresis.
New England J. Med., 1963, 269, 544-549

AMES (G.), Van DYKE (H.B.)
Antidiuretic hormone in the serum or plasma of rats.
Endocrinology, 1952, 50, 350-360

ANDERSON (W.A.), BROWN (E.)
The influence of arginine-vasopressin upon the production of adenosine 3'-5' monophosphate by adenylcyclase from the kidney.
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 67, 674-676

AUBRY (R.M.), NANKIN (H.R.), MOSES (A.M.), STREETEN (D.H.P.)
Measurement of the osmotic threshold for vasopressin release in human subjects, and its modification by cortisol.
J. Clin. Endocr. Metab., 1965, 25, 1481-1492

AUSTIN (J.), STILLMAN (H.E.), Van SLYKE (D.D.)
Factors governing the excretion rate of urea.
J. Biol. Chem., 1921, 46, 91-112

AVELANGE (J.)
Nanisme hypophysaire et hypervasopressinisme. Etude physiopathologique à propos de 5 observations.
Thèse méd., Nancy, 1968, dactyl., 72 p.

BABA (W.), SMITH (A.), TOWNSEND (M.)
The effect of vasopressin, thiophylline and 3'-5' adénosine monophosphate (cyclic AMP) on sodium transport across the frog skin.
Quart. J. exp. Physiol., 1967, 52, 416-420

BAISSET (A.), MONTASTRUC (P.)
Modification de la diurèse après distension de l'oreillette gauche. Rôle de l'hormone antidiurétique.
Path. Biol., 1959, 7, n°15-16, 1691-1702

BAISSET (A.), MONTASTRUC (P.)
L'antagonisme cortico-hypophysaire. Confrontation des données expérimentales et cliniques.
Sem. Hôp. Paris, 1959, 35, 2393-2396

BALLARD (P.L.), TOMKIMS (G.M.)
Hormone induced modification of the cell surface.
Nature, 1969, 224, 344-345

BARGER (A.C.), BERLIN (R.D.), TULENKO (J.F.)
Infusion of aldosterone, 9-α-fluorohydrocortisone and antidiuretic hormone into the renal artery of normal and adrenalectomized, unanaesthetized dogs : effect on electrolyte and water excretions.
Endocrinology, 1958, 62, 804-815

BARNES (L.D.), HUI (Y.S.F.), FROHNERT (P.P.), DOUSA (T.P.)
Subcellular distribution of the enzymes related to the cellular action of vasopressin in renal medulla.
Endocrinology, 1975, 96, 119-128

BASTIDE (F.), JARD (S.)
Action de la noradrénaline et de l'ocytocine sur le transport actif du sodium et la perméabilité à l'eau de la peau de grenouille.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 150, 113-123

BEARDWELL (C.G.)
Radioimmunoassay of arginine vasopressin in human plasma.
J. clin. Endocr. Metab., 1971, 33, 254-260

BECK (N.P.), REED (S.W.), MURDAUGH (H.V.), DAVIS (B.B.)
Effects of catecholamines and their interaction with other hormones on cyclic 3'-5' adenosine monophosphate of the kidney.
J. clin. Invest., 1972, 51, 939-944

BERDE (B.), BOISSONNAS (R.A.)
Basic pharmacological properties of synthetic analogues and homologues of the neurohypophysial hormones.
In : Handbook of Experimental Pharmakologie, ed. B. BERDE, Springer Verlag, Berlin (1968), vol. 23, p.p 802-870

BERLINER (R.W.), KENNEDY (T.J.), ORLOFF (J.)
Factors affecting the transport of potassium and hydrogen ions by the renal tubule.
Arch. intern. Pharmacodyn., 1954, 97, 299-312

BERSON (S.A.), YALOW (R.S.), BAUMAN (A.), ROTSCHILD (M.A.), NEWERLY (K.)
Insulin-I^{131} métabolism in human subjects : demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects.
J. clin. Invest., 1956, 35, 170-190

BERSON (S.A.), YALOW (R.S.)
Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody.
J. clin. Invest., 1959, 38, 1996-2016

BERSON (S.A.), YALOW (R.S.)
Immunoassay of protein hormones.
In : The Hormones, ed. Pincus, Thiman and Astwood, Academic Press, Inc., New-York (1964), vol. IV, p. 557

BIRNBAUMER (L.), YANG (P. Ch.)
Studies on receptor-mediated activation of adenylyl cyclases.
I - Preparation and description of general properties of an adenylyl cyclase system in beef renal medullary membranes sensitive to neurohypophyseal hormones.
J. biol. Chem., 1974, 249, n°24, 7848-7856

BIRNIE (J.H.), EVERSOLE (W.J.), BOSS (W.R.), OSBORN (C.H.), GAUNT (B.)
An antidiuretic substance in the blood of normal and adrenalectomized rats.
Endocrinology, 1950, 47, 1-12

BIRNIE (J.M.)
Inactivation of posterior pituitary antidiuretic hormone by lever extracts.
Endocrinology, 1953, 52, 33-38

BOCKAERT (J.), ROY (C.), RAJERISON (R.), JARD (S.) (a)
Specific binding of {^{3}H} lysine-vasopressin to pig kidney plasma membranes. Relation of receptor occupancy to adenylate cylase activation.
J. biol. Chem., 1973, 248, 5922-5931

BOCKAERT (J.), ROY (C.), RAJERISON (R.), JARD (S.) (b)
Application de la théorie de l'occupation aux récepteurs rénaux de la lysine-vasopressine à l'adényl-cyclase.
C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Paris, 1973, 276, 649-652

BOCKAERT (J.) (c)
Les récepteurs moléculaires de l'hormone antidiurétique et leurs relations fonctionnelles avec l'adényl-cyclase membranaire.
Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, 1973, dactyl., 122 p.

BONJOUR (J.P.), MALVIN (R.L.)
Stimulation of ADH release by the renin-angiotensin system.
Amer. J. Physiol., 1970, 218, 791-799

BOURGUET (J.)
Cinétique de la perméabilisation de la vessie de grenouille par l'ocytocine. Rôle du 3'-5' adénosine monophosphate cyclique.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 150, 104-112

BRAUN (T.), HECHTER (O.)
Glucocorticoid regulation of ACTH sensitivity of adenyl-cyclase in Rat fat cell membranes.
Proc. Nat. Acad. Sci., 1970, 66, 995-1001

BRAY (G.A.)
A simple efficient liquid scintillation for counting aqueous solution in a liquid scintillation counter.
Anal. Biochem., 1960, 1, 279-285

BROWN (E.), CLARKE (D.L.), ROUX (V.), SHERMAN (D.H.)
The stimulation of adenosine 3'-5' monophosphate production by antidiuretic factors.
J. biol. Chem., 1963, 238, PC 852

BUCKINGHAM (J.C.), HODGES (J.R.)
Interrelationships of pituitary and plasma corticotrophin and plasma corticosterone in adrenalectomized and stressed, adrenalectomized rats.
J. Endocr., 1974, 63, 213-222

BURGUBURU (A.M.), GEELEN (G.)
A radioimmunoassay applied to vasopressin half life determination in normal humans.
C. R. Soc. Biol., 1974, 168, n°8-9, 965

BURLET (A.)
Contribution à l'étude de la synthèse hormonale au niveau du noyau supra-optique du rat dans différentes conditions expérimentales. - Détection histochimique et dosage de quelques phosphohydrolases.
Thèse de Docteur en Spécialité, Nancy, 1971, dactyl., 98 p.

BURLET (A.), MARCHETTI (J.), BOULANGÉ (M.), LEGAIT (E.)
Bilan de la vasopressine et modifications enzymologiques du système hypothalamo-neurohypophysaire du rat après surrénalectomie.
J. Physiol. (Paris), 1972, 65, 207-208 A

BURLET (A.), MARCHETTI (J.), DUHEILLE (J.)
Immunohistochemistry of vasopressin : study of the hypothalamo-neurohypophysial system of normal, dehydrated and hypophysectomized Rats.
In : Neurosecretion - The final neuroendocrine pathway - VI international Symposium on Neurosecretion, London 1973 - ed. F. KNOWLES and L. VOLLRATH, 6 p.

Mc CANN (S.M.), FRUIT (A.), FULFORD (B.D.)
Studies on the loci of action cortical hormones in inhibiting the release of adrenocorticotrophin.
Endocrinology, 1958, 63, 29-42

CAVARELLO (C.), DOVA (E.), ROSSI (L.)
Antidiuretic activity in neurohypophysis of rats after adrenalectomy and replacement therapy.
J. Endocr., 1954, 10, 228-237

CHABRIA (N.L.), GAITONDE (B.B.)
Effect of dexamethasone on urine output and electrolyte excretion in rats.
Arch. intern. Pharmacodyn., 1966, 162, 2, 364-370

CORVOL (P.), ULMANN (A.), MENARD (J.)
Mode d'action des minéralocorticoïdes : leur liaison à la transcortine et au récepteur cytosolique rénal.
J. Urol. Néphrol., 1975, 81, 312-319

CHASE (L.R.), AURBACH (G.D.)
Renal adenyl cyclase : anatomically separate sites for parathyroïd hormone and vasopressin.
Science, 1968, 159, 545-547

COREY (E.L.), SILVETTE (H.), BRITTON (S.W.)
Hypophyseal and adrenal influence of renal function in the Rat.
Amer. J. Physiol., 1939, 125, 644-651

CORTNEY (M.A.)
Renal tubular transfer of water and electrolytes in adrenalectomized rats.
Amer. J. Physiol., 1969, 216, n°3, 589-598

COX (G.S.), HODGES (J.R.), VERNIKOS (J.)
The effect of adrenalectomy on the circulating level of adrenocorticotrophic hormone in the Rat.
Endocrinology, 1958, 17, 177-181

CRABBÉ (J.)
Effects of corticosteroids on sodium transport by, and permeability to water of a living membrane.
Proceedings of the 2nd International Congress of Nephrology, Prague 1963, J. VOSTAL and G. RICHET editors, Excerpta Medica Foundation, New-York, p. 548

CRABBE (J.)
Le mode d'action de l'aldostérone.
Dans : Hormones et régulations métaboliques hydro-électrolytique, glucidique et lipidique - Rapport de la 12ème réunion des Endocrinologistes de langue française - CHU Pitié-Salpêtrière, sept. 1973 - Ed. Masson.

CUILLIER (J.)
Le dosage de l'hormone antidiurétique. Application à l'étude physiopathologique des hyperplasies surrénales congénitales.
Thèse Méd., Nancy, 1967, dactyl 179 p.

CZERNICHOW (P.), REINHARZ (A.), VALLOTTON (M.B.)
Immunochemical analysis of Rabbit antibodies against vasopressin.
Immunochemistry, 1974, 11, 47-53

DALLMAN (M.F.), YATES (F.E.)
Anatomical and functionnal mapping of central neural input and feedback pathways of the adrenocortical system.
Mem. Soc. Endocrinol., 1968, 12, 39-72

DALLMAN (M.F.), JONES (M.T.), VERNIKOS DANELLIS (J.), GANONG (N.F.)
Corticoid feedback control of secretion : rapid effects bilateral adrenalectomy on plasma ACTH in the rat.
Endocrinology, 1972, 91, n°4, 961-968

DALTON (T.), SNART (R.S.)
Effects of hormones on the permeability of toad bladder.
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 135, 1059-1062

DIAMOND (M.C.)
The effect of hypophysectomy, removal of the posterior pituitary, adrenalectomy and dehydratation on the antidiuretic activity of the rat hypothalamic neurohypophyseal system.
Endocrinology, 1956, 58, 461-470

DANIEL (A.R.), LEDERIS (K.)
Effects of ether anaesthesia and haemorrhage on hormone storage and ultrastructure of the rat neurohypophysis.
J. Endocr., 1966, 34, 91-104

DINGMAN (J.F.), DESPOINTES (R.D.)
Adrenal steroid inhibition of vasopressin release from the neurohypophysis of normal subjects and patients with Addison's disease.
J. clin. Invest., 1960, 39, 1851-1863

DOUSA (T.P.), HECHTER (O.)
The effect of NaCl and LiCl on vasopressin sensitive adenyl-cyclase.
Life sci. Physiol. Pharmacol. Part., 1970, 9, 765-770

DOUSA (T.P.), HECHTER (O.), WALTER (R.), SCHWARTZ (I.L.)
(8-arginine)-vasopressinoic acid : an inhibitor of rabbit kidney adenyl-cyclase.
Science (Wash. D.C.), 1970, 167, 1134-1135

DOUSA (T.P.), SANDS (M.), HECHTER (O.)
Cyclic 3'-5' AMP dependent phosphorylation of renal medullary membranes.
Fed. Proc., 1971, 30, 200

DOUSA (T.P.), HECHTER (O.), SCHWARTZ (I.L.), WALTER (R.)
Neurohypophyseal hormone responsive adenylate-cyclase from mammalian kidney.
Proc. nat. Acad. Sci., 1971, 68, 1693-1697

DOUSA (T.P.), SANDS (H.), HECHTER (O.)
Cyclic AMP dependent reversible phosphorylation of renal medullary plasma membrane protein.
Endocrinology, 1972, 91, 757-763

DOUSA (T.P.)
Lithium : interaction with ADH dependant cyclic AMP system in human renal medulla.
Clin. Res., 1973, 21, 282 (abstract)

DOUSA (T.P.), ROWLAND (R.G.), CARONE (F.A.)
Renal medullary adenylate cyclase in drug-induced nephrogenic diabetes insipidus (37101).
Proc. soc. Exp. Biol. Med., 1973, 142, 720-722

DOUSA (T.P.), BARNES (L.D.)
Effects of colchicine and vinblastine on the cellular action of vasopressin in mammalian kidney. A possible role of microtubules.
J. clin. Invest., 1974, 54, 252-262

DOUSA (T.P.), WILSON (D.M.)
Effects of demethylchlortetracycline on cellular action of antidiuretic hormone in vitro.
Kidney Intern., 1974, 5, 279-284

DOUSA (T.P.), VALTIN (H.)
Cellular action of antidiuretic hormone in mice with inherited vasopressin-resistant urinary concentrating defects.
J. clin. Invest., 1974, 54, 753-762

DUARTE (C.G.), CHOMETY (F.), GIEBISCH (G.)
Effect of amiloride, ouabain and furosemide on distal tubular function in the rat.
Amer. J. Physiol., 1971, 221, 632-639

DUNN (F.L.), BRENNAN (T.J.), NELSON (A.E.), ROBERTSON (G.L.)
The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat.
J. clin. Invest., 1973, 52, 3211-3219

EDSTROM (J.), EICHNER (D.), SCHOR (N.)
Quantitative ribonucleic acid measurement in functional studies of nucleus supraopticus.
In : Regional Neurochemistry, p. 274
Edited by KETY (S.), ELKES (J.) - New-York, 1961 - Pergamon Press

EDWARDS (C.R.W.) CHARD (T.), KITAU (M.J.), FORSLING (M.L.)
The development of a radioimmunoassay and a plasma extraction method for vasopressin.
J. Endocr., 1970, 48, n°1, XI-XII

FANESTIL (D.D.), PORTER (G.A.), EDELMAN (I.S.)
Aldosterone stimulation of sodium transport.
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 135, 74-88

FELDMAN (D.), FUNDER (J.W.), EDELMAN (I.S.)
Subcellular mechanisms in the action of adrenal steroids.
Amer. J. Med., 1972, 53, 545-560

FELDMAN (D.), FUNDER (J.W.)
The binding of 18-hydroxydesoxycorticosterone and 18 - hydroxycorticosterone to mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the rat kideny.
Endocrinology, 1973, 92, 1389-1395

FERGUSSON (D.R.), HELLER (H.)
Distribution of neurohypophyseal hormones in mammals.
J. Physiol. (Lond.), 1965, 180, 846-863

FIMOGNARI (G.M.), PORTER (G.A.), EDELMAN (I.S.)
The role of tricarboxylic acid cycle in the action of aldosterone on sodium transport.
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 135, 89-99

FINKENSTAEDT (J.T.), DINGMAN (J.F.), JENKINS (D.), LAIDLAW (J.C.), MERRILL (J.P)
The effect of intravenous hydrocortisone and corticosterone on the diurnal rhythm in renal function and electrolyte equilibria in normal and Addisonian subjects.
J. clin. Invest., 1954, 33, 933

FITZPATRICK (R.J.), BENTLEY (P.J.)
The assay of neurohypophyseal hormones in blood and other body fluids.
In : Handbook of Experimental Pharmacology - Ed B. BERDE, Springer Verlag, Berlin 1968, Vol. 23, pp. 190-285

FORTE (L.R.)
Characterization of the adenyl cyclase of rat kidney plasma membranes.
Biochim. Biophys. Acta, 1972, 266, 524-542

FORTIER (C.)
Nervous control of ACTH secretion.
In : The Pituitary Gland - Vol. II, ed. HARRIS G.W., DONOVAN B.T., Butterworths, London 1966, pp. 195-235

FRESSINAUD (Ph.), CORVOL (P.), MENARD (J.)
Radioimmunoassay of urinary antidiuretic hormone in man : stimulation - suppression tests.
Kidney Intern., 1974, 6, 184-190

FRIEDMANN (N.), EXTON (J.H.), PARK (C.R.)
Interaction of adrenal steroids and glucagon on gluconeogenesis in perfused rat liver.
Biochim. Biophys. Res. Commun., 1967, 29, 113-119

FRINDT (G.), BURG (M.)
Effect of vasopressin on sodium transport in cortical collecting tubules.
Kidney Intern., 1972, 1, 224-231

FUNDER (J.W.), FELDMAN (D.), EDELMAN (I.S.)
Glucocorticoid receptors in rat kidney : the binding of tritiated-dexamethasone
Endocrinology, 1973, 92, 1005-1013

GANONG (W.F.), MULROW (P.J.)
Rate of change in sodium and potassium excretion after injection of aldosterone into the aorta and renal artery of the dog.
Amer. J. Physiol., 1958, 195, 337-342

GARROD (O.), DAVIES (S.A.), CAHILL (G.)
The action of cortisone and desoxycorticosterone acetate on glomerular filtration rate and sodium and water exchange in the adrenalectomized dog.
J. clin. Invest., 1955, 34, 761-776

GAUER (O.H.), HENRY (J.P.), SIKER (M.O.), WENDT (W.E.)
Effect of negative pressure breathing on urine flow.
J. clin. Invest., 1954, 33, 287-296

GAUNT (R.), BIRNIE (J.H.), EVERSOLE (W.J.)
Adrenal cortex and water metabolism.
Physiol. Rev., 1949, 29, 281-310

GAUNT (B.), LLOYD (C.W.), CHART (J.J.)
The adrenal neurohypophysial interrelationship.
In : The Neurohypophysis - ed. HELLER, Academic Press, New-York 1957, p. 233-251

GERSHFELD (N.L.), PAK (C.Y.C.)
Acceleration of structural changes in monolayers by steroid hormones.
Nature, 1968, 219, 495-496

GHARIB (G.)
Le dosage de l'hormone antidiurétique.
Rev. franç. Et. Clin. Biol., 1967, 12, 398-402

GIEBISCH (G.), WINDHAGER (E.E.)
Electrolyte transport across renal tubular membranes.
In : Handbook of Physiology - Section 8 : Renal Physiology, p. 329
Ed. ORLOFF J., BERLINER R.W. - American Physiological Society, Washington, D.C., 1973

GINSBURG (M.)
Secretion of antidiuretic hormone in response to haemorrhage and fate of vasopressin in adrenalectomized rats.
J. Endocr., 1954, 11, 165-176

GINSBURG (M.)
The clearance of vasopressin from the splanchnic vascular area and the kidneys.
J. Endocr., 1957, 16, 217-226

GOCKE (D.J.), GERTEN (J.), SHERWOOD (L.M.), LARAGH (J.H.)
Physiological and pathological variations of plasma angiotensin II in man.
Circulation Res., 1969, 14, 131-146

GOODFRIEND (T.), LEVINE (L.)
Antibodies of bradikinine and angiotensin an use of carbodiimide in immunology.
Science, 1964, 144, 1344-1346

GOTTSCHALK (C.W.), MYLLE (M.)
Micropuncture study of mammalian urinary concentrating mechanism : evidence for the counter current hypothesis.
Amer. J. Physiol., 1959, 196, 927-936

GRANTHAM (J.J.), BURG (M.B.)
Effect of vasopressin and cyclic AMP on permeability of isolated collecting tubules.
Amer. J. Physiol., 1966, 211, 255-259

GRANTHAM (J.J.), BURG (M.B.), ORLOFF (J.)
The nature of transtubular Na and K transport in isolated rabbit renal collecting tubules.
J. clin. Invest., 1970, 49, 1815-1825

GREEN (H.H.), HARRINGTON (A.R.), VALTIN (H.)
On the role of antidiuretic hormone in the inhibition of acute water diuresis in adrenal insufficiency and the effects of gluco- and mineralocorticoïds in reversing the inhibition.
J. clin. Invest., 1970, 49, 1724-1736

GUINNEBAULT (M.), MOREL (F.)
Rôle de la surrénale dans les mécanismes de concentration de l'urine.
C. R. Acad. Sci. (Paris), 1957, 244, 2741-2745

GUINNEBAULT (M.)
Mise en évidence du rôle de l'aldostérone dans le mécanisme de concentration de l'urine.
Rev. franç. Et. Clin. Biol., 1962, 7, 920-926

GÜZEK (J.W.), LESNIK (H.)
The antidiuretic activity of the hypothalamus, hypophysis and blood plasma under various states of water metabolism and adrenergic transmission.
Endokrinologie, 1968, 53, 189-200

GÜZEK (J.W.), LESNIK (H.), TRACZYK (W.Z.)
Mesure du flux de la vasopressine hypothalamique vers la neurohypophyse.
Dans : Neuroendocrinologie - Ed. J. BENOIT et C. KORDON - Colloque nationaux du C.N.R.S, 24-26 septembre 1969, pp. 177-184

HANDLER (J.S.), PRESTON (A.S.), ORLOFF (J.)
Effect of adrenal steroid hormones on the response of the toad's urinary bladder to vasopressin.
J. clin. Invest., 1969, 48, 823-833

HANKISS (J.), KESZTHELYI (M.), DEMENY (P.)
Corticosteroids and vasopressin metabolism.
Kiserl. Orvostud., 1965, 17, n°1, 28-31

HEDGE (G.H.), YATES (M.B.), MARCUS (R.), YATES (F.E.)
Site of action of vasopressin in causing corticotrophin release.
Endocrinology, 1966, 79, 328-340

HELMAN (S.I.), GRANTHAM (J.), BURG (M.B.)
Effect of vasopressin on electrical resistance of renal cortical collecting tubules.
Amer. J. Physiol., 1971, 220, 1825-1832

HENDLER (E.F.), TORRETTI (J.), KUPOR (L.), EPSTEIN (F.H.)
Effects of adrenalectomy and hormone replacement on Na and K.ATPase in renal tissue.
Amer. J. Physiol., 1972, 222, 754-760

HENRY (J.P.), GUPTA (P.D.), MEEHAN (J.P.), SINCLAIR (R.), SHARE (L.)
The role of afferents from the low pressure system in the release of anti-diuretic hormone during non hypotensive heamorrhage.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 1968, 46, 287-295

HIERHOLZER (K.), WIEDERHOLT (M.), STOLTE (H.)
Hemmung der Natriumresorption im proximalen und distalen Konvalert adrenalektomierten Ratten.
Pflügers Arch. ges. Physiol., 1966, 291, 43-62

HIERHOLZER (K.), WIEDERHOLT (M.), HOLZGREVE (H.), GIEBISCH (G.), KLOSE (R.M.), WINDHAGER (E.E.)
Micropuncture study of renal transtubular concentration gradients of sodium and postassium in adrenalectomized rats.
Pflügers Arch. ges. Physiol., 1965, 285, 193-210

HILD (W.), ZETLER (G.)
Über das Vorkommen der Hypophysenhinterlappenhormone in Zwischenhirn.
Arch. exp. Path. Pharmak., 1951, 213, 139-153

HILL (J.H.), CORTAS (N.), WALSER (M.)
Aldosterone action and sodium and potassium activated adenosine triphosphatase in toad bladder.
J. clin. Invest., 1973, 52, 185-189

HIRSCH (W.), MOORE (S.), STEIN (W.H.)
A chromatographic investigation of pancreatic ribonuclease.
J. biol. Chem., 1953, 200, 493-506

HODGES (J.R.), VERNIKOS (J.)
The effects of hydrocortisone on the level of corticotrophin in the blood and pituitary glands of adrenalectomized and of stressed adrenalectomized rats.
J. Physiol., 1960, 150, 683-693

HUNTER (W.M.), GREENWOOD (F.C.)
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specificity activity.
Nature (Lond.), 1962, 194, 495-496

HUSAIN (M.K.), FERNANDO (N.), SHAPIRO (M.), KAGAN (A.), GLICK (S.M.)
Radioimmunoassay of arginine-vasopressin in human plasma.
J. clin. Endocrinol. Metab., 1973, 37, 616-625

HYNIE (S.), SHARP (G.W.G.)
Adenyl cyclase in the toad bladder.
Biochim. Biophys. Acta, 1971, 230, 40-51

JARD (S.)
Le mécanisme d'action de l'hormone antidiurétique.
J. Physiol. (Paris), 1971, 63, 99-146

JARD (S.), BASTIDE (F.)
A cyclic AMP-dependent protein kinase from frog bladder epithelial cells.
Biophys. Res. Commun., 1970, 39, 559-566

JEFFERS (W.A.), LIVEZEY (M.M.), AUSTIN (J.H.)
A method for demonstrating an antidiuretic action of minute amounts of pitressin. Statistical analysis results.
Proc. soc. exp. Biol. Med., 1942, 50, 184-188

JOHNSON (J.A.), ZEHR (J.E.), MOORE (W.W.)
Effects of separate and concurrent osmotic and volume stimuli on plasma ADH in sheep.
Amer. J. Physiol., 1970, 218, 1273-1280

JOHNSTON (C.I.)
Radioimmunoassay for plasma antidiuretic hormone.
J. Endocr., 1972, 52, 69-78

JONES (R.V.H.), de WARDENER (H.E.)
Urine concentration after fluid deprivation or pitressin tannate in oil.
Brit. Med. J., 1956, 1, 271-273

JONES (C.W.), PICKERING (B.T.)
Comparison of the effects of water deprivation and sodium chloride inhibition on the hormone content of the neurohypophysis of the rat.
J. Physiol. (Lond.), 1969, 203, 449-458

KALISKER (A.), DYER (D.C.)
Inhibition of the vasopressin activated adenyl cyclase from renal medullary by prostaglandins.
Europ. J. Pharmacol., 1972, 20, 143-146

KEIL (L.C.), SUMMY-LONG (J.), SEVERS (W.B.)
Release of vasopressin by angiotensin II.
Endocrinology, 1975, 96, 1063-1065

KESSLER (E.), ALLEN (R.L.), KIRMAN (D.), STRAUSS (H.)
Effect of aldosterone and cortisol on sodium and water content of the rat kidney.
Amer. J. Physiol., 1964, 207, 109-112

KHOKHAR (A.M.), SLATER (J.D.H.), FORSLING (M.L.), RAMAGE (C.M.)
The physiological significance of urinary vasopressin and its relationship to plasma levels in man.
In : Abstracts of free communications - VI th International Congress of Nephrology - June 8th-12th 1975 - Firenze (Italy)

KIRSCHBERGER (M.), SCHWARTZ (I.L.), WALTER (R.)
Preparation and properties of cyclic 3'-5' AMP dependent protein kinase activity in toad bladder epithelium.
The Physiologist, 1971, 14, 172-174

KLEEMAN (C.R.), CZACZKES (J.W.), CUTTLER (R.)
Mechanisms of impaired water excretion in adrenal and pituitary insufficiency.
IV- Antidiuretic hormone in primary and secondary adrenal insufficiency.
J. clin. Invest., 1964, 43, 1641-1648

KOEFOED-JOHNSEN (V.), USSING (H.H.)
The nature of the frog skin potential.
Acta Physiol. Scand., 1958, 42, 298-308

KOTTLE (F.J.), CODE (C.F.), WOOD (E.H.)
Urine dilution and concentration tests in adrenalectomized dogs.
Amer. J. Physiol., 1942, 136, 229-243

KUO (J.F.), GREENGARD (P.)
Cyclic nucleotide dependent protein kinases.
IV - Widespread occurence of adenosine 3'-5' monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom.
Proc. nat. Acad. Sci., 1969, 64, 1349-1355

LANG (M.A.), EDELMAN (I.S.)
Effects of aldosterone and vasopressin on adenyl cyclase activity of rat kidney.
Amer. J. Physiol., 1972, 222, 21-24

LEAF (A.)
Some actions of neurohypophyseal hormones on a living membrane.
J. gen. Physiol., 1960, 43, 175-189

LEAF (A.), MAMBY (A.R.), RASMUSSEN (H.), MARASCO (J.P.)
Some hormonal aspects of water excretion in man.
J. clin. Invest., 1952, 31, 914-927

LEGROS (I.J.), FRANCHIMONT (P.)
The purification and modification of immunological and physio-chimical behaviour of iodinated posterior pituitary hormones.
In : Radioimmunoassay Methods - Ed. K.E. KIRKHAM and W.H. HUNTER, Churchill Livingstone 1971, p. 40-54

LIDDLE (G.W.), PECHET (M.M.), BARTTER (F.C.)
Enhancement of biological activities of corticosteroids by substitution halogen atoms in g-alpha position.
Science, 1954, 120, 496-499

LIN (S.Y.), ELLIS (H.)
Preparations and properties of iodinated angiotensins.
Biochem. Pharmacol., 1970, 19, 651-662

LITTLE (J.B.), RADFORD (E.P.)
Bioassay for antidiuretic activity in blood of indisturbed rats.
J. appl. Physiol., 1964, 19, 179-186

LLOYD (C.W.), LOBOTSKY (J.)
Serum antidiuretic substances and urinary corticoid in the human.
J. clin. Endocr., 1950, 10, 318-329

De LORENZO (R.J.), WALTON (K.G.), CURRAN (P.F.), GREENGARD (P.)
Regulation of phosphorylation of a specific protein in toad bladder membrane by antidiuretic hormone and cyclic AMP and its possible relationship to membrane permeability changes.
Proc. nat. Acad. Sci. (U.S.A), 1973, 70, 880-884

LOWRY (O.H.), ROSEBROUGH (N.J.), FARR (A.L.), RANDALL (R.J.)
Protein measurement with Folin phenol reagent.
J. biol. Chem., 1951, 193, 265-275

LUTZ (B.), MIAHLE (C.)
Effet de la dexamethasone sur l'ADH plasmatique immunoreactive du Rat.
5ème Colloque de Neuroendocrinologie, Marseille 13-14 septembre 1973

LUTZ (B.), KOCH (B.), MIAHLE-VOLOSS (C.)
Libération de l'hormone antidiurétique au cours de l'agression systémique et neurotrope chez le Rat.
C. R. Acad. Sci., 1968, 266, série D, 1166-1168

LUTZ (B.), KOCH (B.), MIAHLE (C.)
Libération des hormones antidiurétique au cours de différents types d'agression chez le Rat.
J. Physiol., Paris, 1969, 61, 149

MALNIC (G.), KLOSE (R.M.), GIEBISCH (G.)
Micropuncture study of distal tubular potassium and sodium transport in Rat nephron.
Amer. J. Physiol., 1966, 211, 548-559

MANGANIELLO (V.), VAUGHAN (M.)
An effect of dexamethasone on adenosine 3'-5' monophosphate content and adenosine 3'-5' monophosphate phosphodiesterase activity of cultured hepatoma cells.
J. clin. Invest., 1972, 51, 2763-2767

MANGANIELLO (V.), BRESLOW (J.), VAUGHAN (M.)
An effect of dexamethasone on the cyclic AMP content of human fibroblasts stimulated by catecholamines and prostaglandin E_1.
J. clin. Invest., 1972, 51, 60a

MARCEAU (H.), DELGADO (A.), Mc INTOSH-HARDT (B.), FORTIER (C.)
Metabolic clearance and secretion rates of TSH following adrenalectomy and corticosterone administration in the Rat.
Endocrinology, 1972, 90, 973-980

MARCHETTI (J.)
Immunoassay for lysine-vasopressin (LVP) : comparaison of biological and immunological activity of lysine-vasopressin and some of its synthetic analogues.
Experientia (Basel), 1973, 29, n°3, 351-353

MARCHETTI (J.), BURLET (A.), BOULANGÉ (M.)
Variations de l'hormone antidiurétique chez des Rats soumis à la métopirone.
J. Physiol. (Paris), 1972, 65, 144 A

MARVER (D.), GOODMAN (D.), EDELMAN (I.S.)
Relationships between renal cytoplasmic and nuclear aldostérone receptors.
Kidney Int., 1972, 1, 210-223

MARUMO (F.)
The effect of glucocorticoïd on the water permeability of the toad bladder.
Pflügers Archiv., 1968, 299, 149-157

MARUMO (F.), EDELMAN (I.S.)
Effects of Ca and prostaglandin E_1 on vasopressin activation of renal adenyl cyclase.
J. clin. Invest., 1971, 50, 1613-1620

MATTINGLEY (D.)
A simple fluorimetric method for the estimation of free 11 hydroxycorticoids in plasma.
J. Clin. Path., 1962, 15, 374-379

MENARD (J.), MILLIEZ (P.)
Système de dosage radioimmunologique de l'hormone antidiurétique.
C. R. Acad. Sci. (Paris), 1970, 270, 1053-1056

MENARD (J.), FRESSINAUD (Ph.), BREMINER (J.), FOLIOT (A.), CORVOL (P.)
Les méthodes de dosage de l'hormone antidiurétique. Leur application à l'étude de la secrétion de la vasopressine.
Dans : Hormones et régulations métaboliques hydro-électrolytique, glucidique et lipidique - Rapport de la 12ème réunion des Endocrinologistes de langue française - C.H.U Pitié-Salpêtrière, sept. 1973, Ed. Masson

MIAHLE-VOLOSS (C.), LUTZ (B.), KOCH (B.)
Effet inhibiteur de la dexamethasone sur la secrétion de la vasopressine et dosage ADH.
C. R. Acad. Sci. (Paris), 1967, 264, 2145-2147

MIAHLE (C.), LUTZ (B.), KOCH (B.), BRIAUD (B.)
Effet de l'hypophysectomie et de la dexaméthasone sur l'activité du cortex surrénal du Rat.
C. R. Acad. Sc. (Paris), 1971, 272, 999-1002

MILLER (M.), MOSES (A.M.) *(a)*
Radioimmunoassay of vasopressin with a comparaison of immunological and biological activity in the rat posterior pituitary.
Endocrinology, 1969, 84, n°3, 557-562

MILLER (M.), MOSES (A.M.)
Radioimmunoassay of urinary antidiuretic hormone with application to study of the Brattleboro Rat.
Endocrinology, 1971, 88, 1389-1396

MILLER (M.), MOSES (M.) *(b)*
In vivo and in vitro inactivation of biological activity of vasopressin by antiserum to lysine-vasopressin.
Endocrinology, 1969, 84, n°4, 798-802

MILLER (M.), MOSES (A.M.)
Radioimmunoassay of urinary antidiuretic hormone in man : response to water load and dehydration in normal subjects.
J. clin. Endocr. Metab., 1972, 34, 537-545

MIRSKY (I.A.), STEIN (M.), PAULISCH (G.)
The secretion of an antidiuretic substance into the circulation of rats exposed to noxious stimuli.
Endocrinology, 1954, 54, 491-505

MÖLLER (E.), Mc INTOSCH (J.F.), VAN SLYKE (D.D.)
Studies of urea excretion.
J. clin. Invest., 1929, 6, 427-465

MORAN (W.H.), MILTENBERGER (F.W.), SHUAIB (W.A.), ZIMMERMAN (B.)
The relationship of antidiuretic hormone secretion to surgical stress.
Surgery, 1964, 56, 99-108

MOREL (F.)
Action of neurohypophyseal hormones on the active transport of sodium.
In : Water and electrolyte metabolism II - De GRAEFF and LEIJNSE - Ed. ELSEVIER publishing company, Amsterdam, 1964

MOREL (F.)
Current concepts in renal physiology.
In : Proceedings of the third international congress of nephrology - Ed. J.S. HANDLER - Basel Karger, 1967, vol. 1, 1-17

MOREL (F.), MAETZ (J.), LUCARAIN (C.)
Action de deux peptides neurohypophysaires sur le transport actif du sodium et le flux net d'eau à travers la peau de divers batraciens anoures.
Biochim. Biophys. Acta, 1958, 28, 619-626

MORTON (D.J.), WAIGTH (M.A.)
The possible relationship between the affinity of arginine-vasopressin antibodies and the degree of polyuria and polydipsia in actively immunized rabbits.
J. Endocr., 1972, 54, 523-524

MOSES (A.M.) (a)
Adrenal neurohypophysial relationships in the dehydrated rat.
Endocrinology, 1963, 73, 230-236

MOSES (A.M.), LEVEQUE (T.F.), GIAMBATTISTA (M.), LLOYD (C.M.) (b)
Dissociation between the content of vasopressin and neurosecretory material in the Rat neurohypophysis.
J. Endocr., 1963, 26, 273-278

MOSES (A.M.)
Influence of adrenal cortex on body water distribution in rats.
Amer. J. Physiol., 1965, 208, 662-665

MOSES (A.M.), MILLER (M.)
Osmotic threshold for vasopressin release as determined by saline infusion and by dehydratation.
Neuroendocrinology, 1971, 7, 219-226

MOUW (D.), BONJOUR (J. Ph.), MALVIN (R.L.), VANDER (A.)
Central action of angiotensin in stimulating ADH release.
Amer. J. Physiol., 1971, 220, 239-242

MÜLLER (J.)
Dicreased aldosterone production by rat adrenal tissue in vitro due to treatment with 9 alpha-fluorocortisol, dexamethasone and adrenocorticotrophin in vivo.
Acta Endocr. Kbh., 1970, 63, 1-10

MURAYAMA (Y.), SUZUKI (A.), TADOKORO (M.), SAKAI (F.)
Microperfusion of Henle's loop in the kidney of the adrenalectomized rat.
Jap. J. Pharmacol., 1968, 18, 518

NISONOFF (A.)
Conjugated and synthetic antigen.
In : Method in Immunology and in Immunochemistry, 1967, vol. 1, pp. 120-187
Ed. C.A. WILLIAMS and M.W. CHASE - New-York : Academic Press.

NOBLE (R.L.), RINDERKNECHT (H.), WILLIAMS (P.C.)
The apparent augmentation of pituitary antidiuretic action by various retarding substances.
J. Physiol. (Lond.), 1939, 96, 293-301

ORLOFF (J.), HANDLER (J.S.)
Vasopressin like effects of adenosine 3'-5' phosphate (cyclic 3'-5' AMP) and théophylline in the toad bladder.
Biochem. Biophys. Research Commun., 1961, 5, 63-66

OYAMA (S.N.), KAGAN (A.), GLICK (S.M.)
Radioimmunoassay of vasopressin : application to unestracted human urine.
J. clin. Endocr. Metab., 1971, 33, 739-744

PAINTAL (A.S.)
A study of a right and left atrial receptors.
J. Physiol. (Lond.), 1953, 120, 596-610

PERMUTT (M.A.), PARKER (C.W.), UTIGER (R.D.)
Immunochemical studies with lysine-vasopressin.
Endocrinology, 1966, 78, 809-814

PETERSEN (M.J.), EDELMAN (I.S.)
Calcium inhibition of the action of vasopressin on the urinary bladder of the toad.
J. clin. Invest., 1964, 43, 583-594

POPOVTZER (M.M.), ROBINETTE (J.), HALGRIMSON (C.G.), STARZI (T.E.)
Acute effect of prednisolone on renal handling of sodium.
Amer. J. Physiol., 1973, 224, n°3, 651-658

PRADELLES (P.), MORGAT (J.L.), FROMAGEOT (P.), CAMIER (M.), BONNE (D.), COHEN (P.), BOCKAERT (J.), JARD (S.)
Tritium labelling of 8-lysine-vasopressin and its purification by affinity chromatography on sepharose bound neurophysins.
Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., 1972, 26, 189-192

RAJERISON (R.M.), MARCHETTI (J.), ROY (C.), BOCKAERT (J.), JARD (S.)
The vasopressin sensitive adenylate cyclase of the rat kidney : effect of adrenalectomy and corticosteroids on hormonal receptor/enzyme coupling.
J. biol. Chem., 1974, 249, n°20, 6390-6400

RAMACHANDRAN (J.), LEE (V.)
Divergent effects of O nitrophenyl sulfenyl ACTH on Rat and Rabbit fat cell adenyl cyclases.
Biochim. Biophys. Res. Commun., 1970, 41, 358-366

REVILLE (P.), STEPHAN (F.)
Determination du gradient intrarénal de concentration de l'urée et du sodium chez des rats hypothyroïdiens et des rats surrénalectomisés.
C. R. Soc. Biol., 1967, 161, 174-179

ROBERTSON (G.L.), MAHR (E.A.), ATHAR (S.), SINHA (T.)
Development and clinical application of a new method for the radioimmunoassay of arginine-vasopressin in human plasma.
J. clin. Invest., 1973, 52, 2340-2352

ROBERTSON (G.L.), KLEIN (L.A.), ROTH (J.)
Immunoassay of plasma vasopressin in man.
Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A), 1970, 66, 1298-1305

ROCHA E SILVA (M. Jr), ROSENBERG (M.)
The release of vasopressin in response to haemorrhage and its role in the mechanism of blood pressure regulation.
J. Physiol. (Lond.), 1969, 202, 535-557

ROTHBALLER (A.B.)
Changes in the rat neurohypophysis induced by painfull stimuli with particular reference to neurosecretory material.
Anat. Rec., 1953, 115, 21-42

ROTH (J.), KLEIN (L.A.), PETERSEN (M.J.)
Vasopressin antibodies and a sensitive radioimmunoassay.
J. clin. Invest., 1966, 45, 1064

ROUSSEAU (G.), BAXTER (J.D.), FUNDER (J.W.), EDELMAN (I.S.), TOMKINS (G.M.)
Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors for aldosterone.
J. Steroid Biochem., 1972, 3, 219-227

ROWNTREE (L.G.), SNELL (A.M.)
A clinical study of Addison's disease.
(vol., 317 p., Philadelphie, 1931, Saunders Ed.)

ROY (C.)
Le récepteur de la lysine-vasopressine des membranes de la médullaire de rein de Porc : identification et solubilisation.
Thèse de Doctorat de 3ème cycle, Paris, 1973

SACHS (H.), SHARE (L.), OSINCHAK (J.), CARPI (A.)
The capacity of the neurohypophysis to release vasopressin.
Endocrinology, 1967, 81, n°4, 755-770

SAKAI (F.), MURAYAMA (Y.)
Effects of cortisol on the Henle's loop of the adrenalectomized Rat's kidney.
Jap. J. Pharmacol., 1970, 20, 248-250

SAKAI (K.K.), MARKS (B.H.), GEORGE (J.)
Specific angiotensin II receptors in organ cultured canine supra-optic nuclei cell.
Life Sci., 1974, 14, 1337-1344

SCATCHARD (G.)
The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949, 51, 660-669

SCHAEFFER (L.D.), CHENOWETH (M.), DUNN (A.)
Adrenal corticosteroid involvement in the control of phosphorylase in muscle.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 192, 304-309

SHARE (L.), LEVY (M.N.) (a)
Carotid sinus pulse pressure, a determinant of plasma antidiuretic hormone concentration.
Amer. J. Physiol., 1966, 211, 721-724

SHARE (L.)
Role of peripheral receptors in the increased release of vasopressin in response to haemorrhage.
Endocrinology, 1967, 81, 1140-1146

SHARE (L.), TRAVIS (R.H.)
Plasma vasopressin concentration in the adrenally insufficient dog.
Endocrinology, 1970, 86, 196-201

SHARE (L.), TRAVIS (R.H.)
Interrelations between the adrenal cortex and the posterior pituitary.
Fed. Proc., 1971, 30, n°4, 1378-1382

SHARP (G.W.), LEAF (A.)
Effect of aldosterone and its mechanism of action on sodium transport.
In : Handbook of Physiology - Renal Physiology - Ed. S.R. GEIGER sous la direction de J. ORLOFF et R.W. BERLINER, 1973, 25, 815-830

SIGLER (M.H.), FORREST (J.N.), ELKINTON (J.R.)
Renal concentrating ability in the adrenalectomized Rat.
Clin. Sci., 1965, 28, 29-37

SILVETTE (H.), BRITTON (S.W.)
Theory of cortico-adrenal and postpituitary influence on the kidney.
Science, 1938, 88, 150

SIMPSON (S.A.), TAIT (J.F.), WETTSTEIN (A.), NEHER (R.), von EUW (J.), REICHSTEIN (T.)
Isolierung eines neuen kristallisierten Hormones aus Nebennieren mit besonders hoher Wirksamkeit auf den mineral Stoffwechsel.
Experientia, 1953, 9, 333-335

SKOWSKY (W.R.), ROSENBLOOM (A.A.), FISHER (D.A.)
Radioimmunoassay measurement of arginine-vasopressin in serum : development and application.
J. Clin. Endocr. Metab., 1974, 38, 278-287

STOFF (J.S.), HANDLER (J.S.), ORLOFF (J.)
The effect of aldosterone on the accumulation of adenosine 3'-5' cyclic monophosphate in toad bladder epithelial cells in response to vasopressin and theophylline.
Proc. Nat. Acad. Sci., 1972, 69, 805-808

STOLTE (H.), BRECHT (J.P.), WIEDERHOLT (M.), HIERHOLZER (K.)
Einfluss von Adrenalectomie und Glucocorticoiden auf die Wasserpermeabilität corticaler Nephronabschnitte der Rattenniere.
Pflügers Arch. ges. Physiol., 1968, 299, 99-127

SZCZEPANSKA-SADOWSKA (E.)
The activity of the hypothalamo-hypophysial antidiuretic system in conscious dogs. II - Role of the left vago sympathetic trunk.
Pflügers Arch., 1972, 335, 147-152

TADOKORO (M.), HAURAGUCHI (I.), TERUOKA (M.), SAKAI (F.)
Microperfusion experiments in collecting ducts of the isolated rat renal medulla in vitro.
Jap. J. Pharmacol., 1968, 18, 272-273

TAKABATAKE (Y.), SACHS (H.)
Vasopressin biosynthesis. III - In vitro studies.
Endocrinology, 1964, 75, 934-943

TAKEBE (K.), KUNITA (H.), SAKAKURA (M.), MORIUCHI (Y.), MASHIMO (K.)
Suppressive effect of dexamethasone on the rise of CRF activity in the median eminence induced by stress.
Endocrinology, 1971, 89, 1014-1019

TATA (P.S.), GAUER (O.H.)
Vasopressin studies in the Rat. I - A sensitive bioassay for exogenous vasopressin.
Pflügers Arch., 1966, 290, 279-285

TAYLOR (A.), MAMELAK (M.), RAVEN (E.), MAFFLY (R.)
Vasopressin : possible role of microtubules and microfilaments in its action.
Science (Wash. D.C), 1973, 181, 347-349

THOMPSON (E.E.), FREYCHET (P.), ROTH (J.)
Monoiodo-oxytocin : demonstration of its biological activity and specific binding to isolated fat cells.
Endocrinology, 1972, 91, 1199-1205

TRAVIS (R.H.), SHARE (L.)
Vasopressin renin cortisol interrelations.
Endocrinology, 1971, 89, 246-253

UFFERMAN (R.C.), SCHRIER (R.W.)
Importance of sodium intake and mineralocorticoid hormone in the impaired water excretion in adrenal insufficiency.
J. clin. Invest., 1972, 51, 1639-1646

ULLRICH (K.J.), BALDAMUS (C.), UHLICH (E.), RUMRICH (G.)
Einfluss von Calciumionen und antidiuretischen Hormon auf den transtubulären Natrium - transport in der Rattenniere.
Pflügers Arch., 1969, 310, 369-376

ULRRICH (K.J.), RUMRICH (G.), FUCHS (G.)
Wasserpermeabilität und transtubulären Wasserflun corticaler Nephronabschnitte bei verschiedenen Diurezezuständen.
Pflügers Arch. ges. Physiol., 1964, 280, 99-119

VALLERON (A.J.)
Methodes statistiques en radioimmunologie.
Dans : Techniques radioimmunologiques, p. 149-172 - INSERM, séminaire hôpital St Antoine, Paris, 15-19 mai 1972

VANDER (A.J.), MALVIN (R.L.), WILDE (W.S.), LAPIDES (J.), SULLIVAN (L.P.), Mc MURRAY (V.W.)
Effects of adrenalectomy and aldosterone on proximal and distal tubular sodium reabsorption.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1958, 99, 323-325

VERNEY (E.B.)
Antidiuretic hormone and the factors which determin its release.
Proc. Roy. Soc., Lond., 1947, 135, 25-106

VILHARDT (H.) (a)
Influence of corticosteroid and chlorpromazine on the release of vasopressin from isolated neural lobes of rats.
Acta Endocr., 1970, 65, 490-496

VILHARDT (H.) (b)
Vasopressin content and neurosecretory material in the hypothalamo-neurohypophyseal system of rats under different states of water metabolism.
Acta Endocr., 1970, 63, 585-594

VORHERR (H.), MUNSICK (R.A.)
Identification of neurohypophysial hormones with their antisera.
J. clin. Invest., 1970, 49, 4, 828-838

WEINSTEIN (H.), BERNE (R.M.), SACHS (H.)
Vasopressin in blood ; effect of haemorrhage.
Endocrinology, 1960, 66, 712-718

WEST (C.D.), TRAEGER (J.), KAPLAN (S.A.)
A comparison of the relative effectiveness of hydrapenia and of pitressin in producing a concentrated urine.
J. clin. Invest., 1955, 34, 887-898

De WIED (D.), MIRSKY (I.A.)
The action of $\Delta_1$hydrocortisone on the antidiuretic and adrenocorticotropic responses to noscious stimuli.
Endocrinology, 1959, 64, 955-966

WIEDERHOLT (M.), STOLTE (H.), BRECHT (J.P.), HIERHOLZER (K.)
Mikropunctionsuntersuchungen über den Einfluss von Aldosteron, Cortison und Dexamethason auf die renale Natriumresorption adrenalektomierter Ratten.
Pflügers Arch. ges. Physiol., 1966, 292, 316-333

WIRZ (H.)
Der osmotische Druck in den cortikalen Tubuli der Rattenniere.
Helvet. Physiol. Acta, 1956, 14, 353-362

WRAAE (O.), GEISLER (A.), OLESEN (O.V.)
The relation between vasopressin stimulation of renal adenyl cyclase and lithium induced polyuria in Rats.
Acta Pharmacol. Toxicol., 1972, 31, 314-317

WU (W.H.), ROCKEY (J.H.)
Antivasopressin antibody. Characterization of high affinity rabbit antibody with limited association constant heterogeneity.
Biochem. N.Y., 1969, 8, 2719-2728

YUNIS (S.L.), BERCOVITCH (D.D.), STEIN (B.M.), LEVIT (M.F.), GOLDSTEIN (M.H.)
Renal tubular effects of hydrocortisone and aldosterone in normal hydropenic man : comment on site of action.
J. clin. Invest., 1964, 43, 1668-1676

ZAMBRANO (D.), De ROBERTIS (E.)
The secretory cycle of supraoptic neurons in the rat.
Z. Zellforsch., 1966, 73, 414-431